



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Papel das regiões C2-V3-C3 na indução de anticorpos
neutralizantes anti-VIH-2**

Autor: Débora Joana Rodrigues Lopes de Almeida

Orientador: Investigador Doutor José Marcelino

Coorientador: Prof. Doutor Celso Cunha

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à pessoa que tornou possível a escrita desta dissertação, por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades desde o início, e por isso, ter permitido que eu ingressasse neste mestrado. Obrigada **mãe** por teres sido não só o meu suporte financeiro mas também por seres o meu suporte emocional e psicológico. Obrigada por puxares sempre por mim, por estares sempre do meu lado e por poder contar sempre contigo.

Ao meu orientador, **Investigador Doutor José Marcelino**, por me ter dado a oportunidade de trabalhar neste tema. Quero agradecer-lhe pelo apoio dado, pela compreensão e paciência que teve comigo. Obrigada por todos os comentários, sugestões e críticas construtivas que permitiram a elaboração desta dissertação.

Ao meu coorientador, **Prof. Doutor Celso Cunha**, por, primeiro que tudo, me ter aceite como aluna no mestrado e, em segundo, por me ter acolhido tão bem no laboratório, por todo apoio dado e por animar os meus dias com a sua boa disposição.

Ao **João Tavanéz** por tudo. Obrigada por me ensinares tanto, desde a matemática mais básica aos procedimentos que me permitiram chegar ao fim de mais esta etapa. Obrigada também por me chamares fatalista e me dares tantas vezes na cabeça, incentivando-me a fazer mais e melhor, por estares sempre presente e por todo o apoio e, acima de tudo, pela tua (santa) paciência. Ah! E peço desculpa se este agradecimento tem muitas vírgulas mas há coisas que nunca mudam.

Ao **David Mateus**, pela amizade, pelo companheirismo, por aturar o meu mau humor no laboratório e fora dele. Obrigada por seres o Mr. Google do laboratório e por me teres ensinado tanta coisa. Obrigada por seres o meu muro das lamentações, por nunca me deixares desistir e por puxares sempre por mim.

Às manas **Ana Rita Pedrosa e Cátia Pedrosa**, primeiro quero pedir desculpa por ter atrapalhado os vossos treinos no ginásio com os meus desesperos e lamúrias quando as coisas corriam menos bem. Depois quero agradecer muito por torcerem sempre por mim e não me deixarem desistir, pela companhia nas maratonas de escrita. Acima de tudo,

agradeço pela amizade, que mesmo sendo recente, já é muito importante e é a prova de que quantidade não é qualidade.

À **Mariana Fernandes**, por ter sido uma excelente colega nos trabalhos de grupo, por nunca desistir mesmo quando o cansaço era muito e por todas as discussões construtivas que tivemos. Obrigada por todas as vezes que me ajudaste durante o meu trabalho de bancada para que eu chegasse a horas ao meu emprego e por seres uma colega de corredor do laboratório tão boa, mesmo quando me acertavas com o armário ao saíres da tua secretária. Gostaria de poder continuar a sentar-me costas com costas contigo, em qualquer laboratório deste mundo porque além de uma excelente profissional e colega, és uma amiga espectacular.

À **Ana Bolas**, por ser uma amiga tão querida e uma colega de laboratório tão boa, cheia de energia positiva. Obrigada por seres tão prestável, por me teres ajudado sempre que precisei e por me animares em dias menos bons. Obrigada por me teres recebido tão bem no laboratório, a tua amizade e companheirismo foram muito importantes.

A todas as outras pessoas que faziam parte do laboratório e que com o seu companheirismo tornaram tudo melhor. Obrigada por me terem recebido tão bem, por me fazerem sentir integrada, por ouvirem as minhas dúvidas, as minhas queixas e os meus risos de alegria. Obrigada **Armanda, Joana, Maria e Mafalda**. Em especial, à **Prof. Doutora Gabriela Santos-Gomes** por me deixar fazer do seu gabinete consultório de psicologia, por me ter acolhido tão bem no laboratório e por todo o apoio. Percebo quase tanto de Leishmaniose como de VIH. Quase.

A todas as minhas colegas das aulas de mestrado e ao único rapaz da turma também, por serem uma boa turma e por terem tornado as aulas mais interessantes. Em especial, gostaria de agradecer a uma das minhas colegas de mestrado, a **Carla Tavares** por todo o seu esforço em todos os trabalhos de grupo, mesmo tendo um trabalho/emprego super exigente. Obrigada por todas as maratonas de estudo em que puxávamos uma pela outra. Eu e, acho que posso falar pela Mariana, agradecemos-te por todas as gargalhadas que nos fizeste dar com as tuas “cromices”. Tu também és uma colega que se tornou amiga e que eu espero que seja por muito tempo. Foste um exemplo a seguir por mim, uma inspiração. Tu és a prova de que quando tudo se quer, tudo se consegue.

A todas as pessoas que de uma forma indirecta contribuíram para a finalização desta etapa, por estarem sempre presentes e por terem puxado sempre por mim. Ao **Fernando Rôxas** que não escolheu de todo a ciência como modo de vida mas que já é quase cientista só de me ouvir falar tanto. Obrigada por toda a compreensão e apoio, por me incentivares e, acima de tudo, pela paciência com que me ouvias pensar alto, mesmo depois de teres estado tantas horas a trabalhar. Agradeço até as “piadinhas” que fazias, mesmo aquelas que eu fingia não achar piada nenhuma porque me relembraste que isto da ciência até pode ter graça. À **Madalena Barbosa**, pela amizade, por ser tão boa ouvinte, por todos os “força miúda!” que me disse e por ter sido uma excelente colega de trabalho. Se alguma vez te obriguei a trabalhar mais horas para que eu pudesser estar no laboratório, desculpa-me e obrigada. Um dia quando voltarmos a trabalhar juntas (como sócias, claro), eu deixo que tu descontes essas horas a mais.

A todas as pessoas cujo nome não consta dos agradecimentos e que de alguma forma contribuíram para a elaboração desta dissertação. A lista é extensa e não posso pôr todos os nomes aqui mas uma dissertação é mais do que todo o trabalho feito e a escrita da mesma. É também ter pessoas que nos apoiam, independentemente da maneira como o fazem. Às vezes uma simples conversa pode fazer a diferença. Por isso, obrigada a todos por tudo o que fizeram por mim e por esta dissertação.

Resumo

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é uma doença grave que se caracteriza pela destruição ou pelo desaparecimento de reações imunitárias do organismo, que permitem o surgimento de infecções oportunistas que podem levar à morte. O agente etiológico responsável pela SIDA é o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e existem dois tipos: o tipo 1 (VIH-1) e o tipo 2 (VIH-2). Quando comparados, o VIH-2 tem uma taxa de transmissão menor e uma progressão da doença mais lenta, o que faz com que os indivíduos infetados tenham um melhor prognóstico. Um dos fatores importantes nesta resposta imunológica é a presença de anticorpos neutralizantes (nAbs) e a pouca capacidade do VIH-2 na evasão a esta resposta. Os nAbs têm a capacidade de inibir a entrada do vírus nas células, através da sua ligação a regiões específicas presentes nas glicoproteínas do invólucro viral. A região V3 do domínio C2V3C3 existente na glicoproteína de superfície do invólucro do VIH-2 é um dos alvos preferenciais dos nAbs. No entanto, desconhece-se ainda de que forma as regiões adjacentes, C2 e C3, contribuem para uma resposta neutralizante. Este estudo teve como objetivos caracterizar o impacto das regiões C2, V3 e C3 na resposta de anticorpos não neutralizantes e neutralizantes na infecção por VIH-2. Para isso, recorreu-se à produção de péptidos recombinantes correspondentes a cada uma das regiões referidas anteriormente através da transformação e crescimento de bactérias competentes *E. coli* TOP10 com plasmídios clonados com fragmentos de ADN das regiões C2, V3 e C3, respetivamente. Após a sua produção, os péptidos recombinantes foram purificados por *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) e utilizados como antígenos em imunoensaios (ELISA), para estudar a reatividade de cada um dos péptidos com um painel de soros positivos para VIH-2. Observou-se maior serorreatividade contra o péptido recombinante V3 (prV3), seguido do prC3 e do prC2. Foram feitas correlações entre os valores obtidos neste estudo e valores obtidos em estudo realizado anteriormente sobre a potência da neutralização dos anticorpos (IC₅₀) presentes em alguns dos soros utilizados. Verificou-se que não havia associação entre a neutralização e a serorreatividade contra cada região, o que pode indicar que os anticorpos neutralizantes produzidos por indivíduos infetados pelo VIH-2 não são específicos para nenhuma das respetivas regiões. No entanto, o número elevado de casos de serorreatividade pode ser indicativo de que as 3 regiões em conjunto possam ser responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes específicos para o domínio C2V3C3, tal como já foi observado anteriormente.

Palavras-chave: infecção VIH-2, região C2V3C3, anticorpos neutralizantes, péptidos recombinantes

Abstract

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a severe disease characterized by destruction or disappearance of the immune reactions of the organism, which enables the appearance of opportunistic infections that can lead to death. The etiological agent responsible for AIDS is the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and there are two types: type 1 (HIV-1) and type (HIV-2). When compared, HIV-2 has a lower transmission rate and a slower progression of the disease, which causes the infected individuals to have a better prognosis. One of the important factors in this immune response is the presence of neutralizing antibodies (nAbs) and the limited capacity of HIV-2 to escape. The nAbs have the ability to inhibit viral entry into cells, through its binding to specific regions present in the viral envelope glycoproteins. The V3 region existing in C2V3C3 domain present on surface glycoprotein of HIV-2 envelope is the main target of nAbs. However, it is still unknown how the adjacent regions, C2 and C3, contribute to a neutralizing response. This study aimed to characterize the impact of the regions C2, V3 and C3 in non-neutralizing and neutralizing antibody response in infection by HIV-2. Therefore, recombinant peptides were produced corresponding to each of the regions mentioned above by transformation and growth of competent bacteria *E. coli* TOP10 with plasmids cloned with DNA fragments of the C2, V3 and C3 regions, respectively. After their production, the recombinant peptides were purified by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) and used as antigens in immunoassays (ELISA) to study the reactivity of each peptide with a panel of positive sera for HIV-2. It was observed a higher seroreactivity against recombinant peptide V3 (prV3), followed by prC3 and prC2. Correlations were made between the values obtained in this study and values obtained in a previous study about the potency of neutralizing antibodies (IC_{50}) present in some of the used sera. It was found that there was no association between the neutralization and seroreactivity against each region, which may indicate that neutralizing antibodies produced by individuals infected with HIV-2 are not specific for any of the respective regions. However, the large number of cases of seroreactivity may be indicative that the three regions together may be responsible for the induction of neutralizing antibodies specific for C2V3C3 domain, as noted earlier.

Key-words: HIV-2 infection, C2V3C3 region, neutralizing antibodies, recombinant peptides

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
I. Introdução	1
1. A SIDA e a descoberta do VIH	1
2. Classificação, origem e diversidade genética do VIH-2	2
3. Epidemiologia	2
4. Transmissão do vírus	3
5. Patogénese do vírus	3
6. Organização estrutural e genómica do vírus	6
6.1. Invólucro viral: constituição e importância	8
7. Ciclo de replicação viral	10
7.1. Utilização de co-recetores para a entrada do vírus na célula	12
7.2. Interação entre gp-SU e co-recetores	14
8. Respostas imunitárias	14
8.1. Imunidade inata	14
8.2. Resposta celular	15
8.3. Resposta humoral	16

8.3.1. Anticorpos neutralizantes	16
8.3.2. Determinantes da neutralização	17
8.3.2.1. Região V3 da gp-SU	18
Enquadramento e objetivos do estudo	20
II. Material e Métodos	21
1. Origem e descrição do vetor plasmídico	21
2. Extração de ADN plasmídico	22
3. Origem e preparação dos <i>primers</i>	23
4. Amplificação de regiões do gene <i>env</i> do VIH-2	25
5. Purificação dos produtos de PCR	26
6. Digestão dupla enzimática	27
7. Purificação dos produtos de digestão	28
8. Clonagem dos fragmentos de ADN obtidos por PCR no vetor	28
8.1. Obtenção do vetor a partir do gel de agarose	28
8.2. Ligação dos produtos de PCR ao vetor plasmídico e transformação bacteriana.....	30
9. Produção de péptidos recombinantes	31
10. Purificação de péptidos recombinantes	32
11. Avaliação da reatividade dos anticorpos contra os péptidos recombinantes	32
11.1. Amostras biológicas	32
11.2. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	33
11.3. Análise estatística	34
III. Resultados	35
1. Clonagem	35

1.1. Caracterização dos <i>primers</i> utilizados e dos fragmentos de ADN a amplificar	35
1.2. Amplificação das regiões C2, V3 e C3, do gene <i>env</i> do VIH-2	36
1.3. Obtenção do vetor plasmídico	38
2. Purificação dos péptidos recombinantes	40
3. Avaliação das reatividades entre anticorpos e péptidos recombinantes	42
3.1. Correlação entre serorreatividade e neutralização dos anticorpos	44
IV. Discussão e Conclusões	49
V. Referências Bibliográficas	55
VI. Anexos	67

Índice de figuras

Figura 1: Evolução da infecção por VIH.	5
Figura 2: Organização estrutural de uma partícula de VIH.	7
Figura 3: Organização genómica do VIH-1 e do VIH-2.	7
Figura 4: Esquema representativo das regiões hipervariáveis (V1 – V5) e das regiões conservadas (C1 – C5) da gp120 do VIH-1.	9
Figura 5: Esquema da estrutura primária da poliproteína precursora Env do VIH-1.	9
Figura 6: Estrutura conformacional de um monómero da gp125 do VIH-2 e da gp120 do VIH-1.	10
Figura 7: Esquema do ciclo de replicação viral.	12
Figura 8: Interação entre as glicoproteínas do VIH-1, o recetor CD4 e o co-recetor (CXCR4 ou CCR5).	13
Figura 9: Estrutura conformacional em trímero da gp125 e a ligação de um Fab anti-V3 do VIH-2.	19
Figura 10: Esquema detalhado sobre o vetor pTrcHis e as suas características.	21
Figura 11: Sequência nucleotídica do gene <i>env</i> do VIH-2.	24
Figura 12: Representação esquemática da aplicação dos antígenos e dos soros a testar.	33
Figura 13: Sequência nucleotídica correspondente à região C2 do gene <i>env</i> (5' → 3').	35
Figura 14: Sequência nucleotídica correspondente à região V3 do gene <i>env</i> (5' → 3').	35
Figura 15: Sequência nucleotídica correspondente à região C3 do gene <i>env</i> (5' → 3').	35
Figura 16: Visualização dos produtos de amplificação do ADN por PCR, após eletroforese em minigel de agarose a 1%, em tampão TAE 1X e brometo de etídeo (1:20000, <i>stock</i> 10%).	37
Figura 17: Visualização dos produtos obtidos após separação por eletroforese em minigel de agarose a 0,8%, em tampão TAE 1X e brometo de etídeo (1:20000, <i>stock</i> 10%).	38
Figura 18: Visualização dos produtos resultantes da digestão dupla do ADN plasmídico dos vetores pTrcC2, pTrcV3 e pTrcC3, respetivamente, após separação por eletroforese em minigel de agarose a 1%.	39
Figura 19: Exemplo de um cromatograma obtido durante o processo de purificação de um péptido recombinante.	41

Figura 20: Reatividade dos anticorpos IgG contra a região C2, V3 e C3, respetivamente.	44
Figura 21: Relação entre a potência dos anticorpos neutralizantes heterólogos e a reatividade dos anticorpos que reagiram contra o péptido recombinante C2.	46
Figura 22: Relação entre a potência dos anticorpos neutralizantes heterólogos e a reatividade dos anticorpos que reagiram contra o péptido recombinante V3.	47
Figura 23: Relação entre a potência dos anticorpos neutralizantes heterólogos e a reatividade dos anticorpos que reagiram contra o péptido recombinante C3.	48

Índice de tabelas

Tabela 1: Caracterização dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de ADN por PCR.	25
Tabela 2: Condições utilizadas durante o PCR para a amplificação do ADN das regiões C2, V3 e C3.	26
Tabela 3: Descrição das misturas de reação utilizadas na clonagem.	30
Tabela 4: Caracterização das regiões C2, V3 e C3, quanto ao tamanho do fragmento e número de aminoácidos que originam.	36
Tabela 5: Concentração de péptido recombinante ($\mu\text{g/mL}$) obtido nas alíquotas numeradas de 1 a 15, após quantificação no espectrofotómetro NanoDrop™, com Abs = 280.	42
Tabela 6: Serorreatividade de cada soro testado contra todos os péptidos recombinantes produzidos.	43
Tabela 7: Potência da resposta neutralizante por anticorpos IgG, presentes em amostras de doentes infetados por VIH-2.	45

Lista de abreviaturas

aa – aminoácidos

Abs – absorvância

ADN – ácido desoxirribonucleico

ARN – ácido ribonucleico

ARNm – ácido ribonucleico mensageiro

Bregs – células B reguladoras, do inglês “*regulatory B cells*”

BSA – albumina de soro bovino, do inglês “*bovine serum albumin*”

CA – cápside viral

CDC – Centro de Controlo de Doenças

CIAP – do inglês “*calf intestine alkaline phosphatase*”

CRF – formas recombinantes circulantes, do inglês “*circulating recombinant form*”

DC – células dendríticas, do inglês “*dendritic cells*”

DNA – do inglês “*deoxyribonucleic acid*”

DO – densidade óptica

dsDNA – do inglês “*double stranded deoxyribonucleic acid*”

ELISA – do inglês “*enzyme-linked immunosorbent assay*”

EUA – Estados Unidos da América

Fab – do inglês “*Fragment antigen binding*”

FPLC – do inglês “*fast protein liquid chromatography*”

g – aceleração da gravidade

g – grama

gp-SU – glicoproteína de superfície

gp-TM – glicoproteína transmembranar

h – horas

HIV – do inglês “*human immunodeficiency virus*”

HTLV – do inglês “*human T-lymphotropic virus*”

IC₅₀ – do inglês “*fifty percent inhibitory concentrations*”

IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranósido

kDa – kilodalton

L – litro

LAV – do inglês “*lymphadenopathy-associated virus*”

mAbs – anticorpos monoclonais, do inglês “*monoclonal antibodies*”

MCS – do inglês “*multiple cloning site*”

mL – mililitro

MM – marcador molecular

MPER – do inglês “*membrane proximal external region*”

mRNA – do inglês “*messenger ribonucleic acid*”

nAbs – anticorpos neutralizantes, do inglês “*neutralizing antibodies*”

NK – do inglês “*natural killers*”

nm – nanómetro

ON – do inglês “*overnight*”

pb – pares de bases

PCR – reação de polimerase em cadeia, do inglês “*polymerase chain reaction*”

pr – péptido recombinante

RNA – do inglês “*ribonucleic acid*”

rpm – rotações por minuto

RT – transcriptase reversa, do inglês “*reverse transcriptase*”

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

SIVcpz – do inglês “*Simian Immunodeficiency Virus from chimpanzee*”

SIVsmm – do inglês “*Simian Immunodeficiency Virus from sooty mangabey monkeys*”

ssRNA – ácido ribonucleico de cadeia simples, do inglês “*single-stranded ribonucleic acid*”

TAE – tampão Tris-Acetato-EDTA

TBS – tampão Tris Salino, do inglês “*Tris-Buffered Saline*”

TRIM5 α – do inglês “*Tripartite motif protein isoform 5 alpha*”

UNAIDS – do inglês “*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*”

URF – forma recombinante única, do inglês “*Unique Recombinant Form*”

V – volt

VIH – vírus da imunodeficiência humana

I. Introdução

1. A SIDA e a descoberta do VIH

Em 1981 começaram a surgir e a serem descritos, em indivíduos homossexuais, casos de infeções oportunistas e de cancros raros que implicavam a deterioração do sistema imunitário para o seu desenvolvimento. A pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* (referida antigamente por *Pneumocystis carinii*) e o Sarcoma de Kaposi são algumas dessas doenças (CDC, 1981). Devido ao aumento do número de indivíduos com o sistema imunitário debilitado, o Centro de Controlo de Doenças (CDC) atribuiu o nome de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) à doença que inicialmente parecia só afetar homossexuais. No entanto, em 1983, começaram a ser conhecidos casos de SIDA em indivíduos que utilizavam drogas injetáveis, em mulheres por contacto sexual com homens infetados, em crianças por transmissão materna e em indivíduos imunocomprometidos, tais como os hemofílicos (CDC, 1983; Essex *et al.*, 1983; Harris *et al.*, 1983; Oleske & Minnefor, 1983; Lazzarin *et al.*, 1984).

Foi no mesmo ano de 1983 que foi isolado, a partir de uma amostra de sangue de um paciente com SIDA, por Françoise Barré-Sinoussi e por Luc Montagnier, do Instituto Pasteur em França, o vírus responsável pela SIDA, denominado primeiramente de Vírus T-linfotrópico Humano tipo III (do inglês *Human T-Lymphotropic Virus type II*, HTLV-III) ou Vírus Associado a Linfadenopatia (do inglês *Lymphadenopathy-Associated Virus*, LAV) e posteriormente de Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (VIH-1 ou, do inglês *Human Immunodeficiency Virus type 1*, HIV-1) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984).

Três anos mais tarde, em 1986, doentes internados no hospital Egas Moniz em Lisboa, provenientes de África Ocidental, apresentavam sintomas semelhantes aos de SIDA. A partir de amostras recolhidas dos indivíduos doentes, foi isolado um novo tipo de retrovírus, que apresentava semelhanças morfológicas com o VIH-1. Contudo, os indivíduos apresentavam serologia negativa para o mesmo. Assim, o novo vírus foi denominado de LAV-II e também alterado posteriormente para Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2 (VIH-2 ou, do inglês *Human Immunodeficiency Virus type 2*, HIV-2) (Clavel *et al.*, 1986).

2. Classificação, origem e diversidade genética do VIH

Ambos os tipos de VIH pertencem à família *Retroviridae* e à subfamília *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus*. Os vírus pertencentes a este género caracterizam-se por causarem infeções crónicas em espécies mamíferas (Sharp *et al.*, 2011).

A origem do VIH-1 e do VIH-2 deve-se a transmissões zoonóticas sucessivas de dois vírus distintos, que causam imunodeficiência nos símios, sendo eles o *Simian Immunodeficiency Virus from chimpanzee* (SIVcpz) no caso de VIH-1 e o *Simian Immunodeficiency Virus from sooty mangabey monkeys* (SIVsmm) para o caso do VIH-2 (Sharp *et al.*, 2011; Nyamweya *et al.*, 2013).

Com base na diversidade genética, o VIH-1 foi classificado em 4 grupos (M, N, O e P). Os vírus do grupo M são os responsáveis pela pandemia e podem ainda ser divididos em 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) (Sharp *et al.*, 2011) e 6 sub-subtipos (A1 – A4 e F1 – F2) (Barroso *et al.*, 2011; Brun-Vézinet & Charpentier, 2013). Também já foram encontradas pelo menos 72 formas recombinantes circulantes (do inglês *Circulating Recombinant Form*, CRF) (*Los Alamos HIV database*, 2015) e formas recombinantes únicas (do inglês *Unique Recombinant Form*, URF) (Buonaguro *et al.*, 2007).

O VIH-2 está dividido em 8 grupos genéticos (A – H). No entanto, os grupos A e B são os principais responsáveis pela epidemia, sendo o grupo A o mais prevalente (de Silva *et al.*, 2008; Borrego & Taveira, 2013). Também já foi identificada uma CRF para o VIH-2 (Ibe *et al.*, 2010).

3. Epidemiologia

Segundo um relatório de 2014 da *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS), desde o início da pandemia em 1985 mais de 78 milhões de pessoas foram infetadas pelo VIH e 39 milhões de pessoas morreram (UNAIDS, 2014).

Geograficamente, a distribuição do VIH-1 é a nível mundial, enquanto o VIH-2 encontra-se principalmente no Oeste de África, ou seja, Costa do Marfim, Guiné-Bissau, Gambia, Senegal e Cabo Verde, mas também em alguns países com ligações

socioeconómicas a essa região de África, tais como, Portugal, França, Índia e Brasil. Uma explicação para a discrepância geográfica está nas taxas de transmissão de ambos os vírus, sendo que o VIH-1 é mais facilmente transmitido do que o VIH-2 (de Silva *et al.*, 2008; Sharp *et al.*, 2011).

4. Transmissão do vírus

O VIH pode transmitir-se por contacto sexual, por contacto com sangue infetado através de transfusões ou partilha/utilização de objetos cortantes ou perfurantes, por utilização de drogas injetáveis devido à partilha de seringas e, ainda, por transmissão vertical, ou seja, de mãe para filho, quer durante o parto, quer por amamentação (Cohen *et al.*, 2011; Shaw & Hunter 2012).

A taxa de transmissão do VIH-1 é mais elevada na fase aguda da infeção, em que a replicação viral é maior e, consequentemente, a carga viral é mais elevada (Cohen *et al.*, 2011). Esta correlação também pode explicar o facto de o VIH-2 ter uma taxa de transmissão mais baixa ou quase nula no caso de transmissão vertical, já que a carga viral presente numa infeção por VIH-2 é baixa (Popper *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2011).

A transmissão do vírus está também correlacionada com a presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, tais como a sífilis e vários tipos de hepatites. Isto deve-se ao facto das vias de transmissão das infeções serem as mesmas, assim como as respostas imunitárias provocadas poderem potenciar o risco de coinfeções (Marschalkó *et al.*, 2015).

5. Patogénese do vírus

O curso da infeção por VIH não é sempre igual ao longo do tempo, sendo que a mesma pode ser dividida em 3 fases. A fase aguda (ou infeção primária) começa ao fim de duas a quatro semanas depois da transmissão do vírus, em que ocorre uma depleção acentuada de células T CD4+ presentes no sangue periférico. Simultaneamente, a replicação viral aumenta rapidamente, fazendo com que a virémia no plasma seja elevada até atingir um pico, ao fim de 21 a 28 dias após a infeção (Pantaleo & Fauci, 1996;

Mogensen *et al.*, 2010; Moir *et al.*, 2011). É nesta fase que os indivíduos infectados começam a sentir sintomas, normalmente muito semelhantes a uma gripe, e que os anticorpos produzidos contra o vírus podem ser detetados, 3 a 4 semanas após a infeção (Mogensen *et al.*, 2010; Moir *et al.*, 2011).

Devido às respostas celulares e humorais, a replicação viral diminui, fazendo com que o nível da carga viral atinja um ponto de estabilidade, o que juntamente com o aumento do número de células T CD4+ circulantes até valores considerados normais (aproximadamente 500 – 700 células por μL de sangue), faz com que se dê a entrada na fase crónica de infeção, caracteristicamente assintomática e que pode durar vários anos (Derdeyen & Silvestri, 2005; Mogensen *et al.*, 2010). Nesta fase, a taxa de replicação viral é menor, a depleção de células T CD4+ no sangue periférico acontece mais lentamente (Derdeyen & Silvestri, 2005) e a ativação do sistema imunitário ocorre de forma generalizada, através de um aumento da renovação celular, com aumento de linfócitos mais ativados e diferenciados, assim como uma indução da exaustão celular, em que as células imunitárias efectoras deixam de ter capacidades funcionais e proliferativas (Moir *et al.*, 2011). Com esta constante ativação imune, o sistema imunitário entra em falência (Pantaleo & Fauci, 1996), após ativação de células B policlonais e da apoptose em grande número de células T CD4 e T CD8 (Ford *et al.*, 2009), fazendo com que surjam os casos de infeções oportunistas ou de doenças neoplásicas. Quando isto acontece, o indivíduo entra numa fase sintomática da infeção que pode progredir para SIDA, com o aumento acentuado da replicação viral e com a diminuição do número de células T CD4+ para menos de 200 células/ μL , no caso de infeção por VIH-1. A figura 1 representa o curso da infeção por VIH, por demonstração

da quantidade de células T CD4⁺ circulantes e a quantidade de cópias de ARN viral presentes no sangue ao longo das várias fases da infecção.

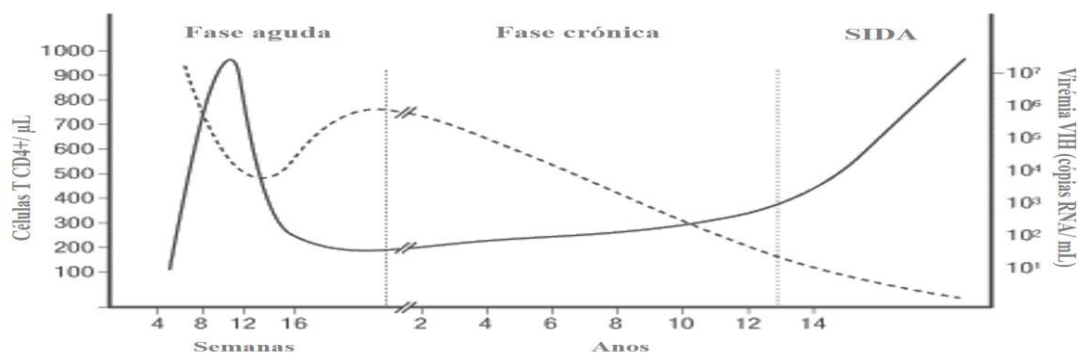


Figura 1: Evolução da infecção por VIH (Adaptado de Fanales-Belasio et al., 2010). A linha a tracejado representa a quantidade de células T CD4⁺ circulantes e a linha contínua representa a quantidade de cópias de ARN viral presentes no sangue.

Os indivíduos infetados por VIH-2, quando comparados com os indivíduos infetados por VIH-1, apresentam uma viremia baixa ou inexistente no plasma (Popper *et al.*, 2000) mas também uma maior suscetibilidade ao controlo por parte do sistema imunitário, embora a ativação imunitária seja mais reduzida, o que faz com que estes indivíduos consigam sobreviver durante mais tempo, sem surgimento de doenças oportunistas (Berry *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 2011). A carga viral mais baixa pode dever-se a diferenças na transcrição, já que as taxas de replicação do VIH-2 são mais baixas, comparativamente ao VIH-1, ainda que a carga de ADN proviral seja semelhante para ambos os vírus (Popper *et al.*, 2000). Tudo isto, permite que a transmissibilidade do vírus do tipo 2 seja mais baixa. No entanto, os indivíduos infetados pelo VIH-2 também progridem para a fase de SIDA, ainda que a progressão ocorra de forma mais lenta (Nyamweya *et al.*, 2013).

A coinfeção com ambos os vírus também pode ocorrer, independentemente da ordem pelas quais as infeções acontecem. Nenhum dos vírus confere proteção contra o outro. No entanto, observou-se que se os indivíduos forem primeiramente infetados com VIH-2, a segunda infeção por VIH-1 será menos patogénica (Esbjornsson *et al.*, 2012).

As diferenças na patogénese dos dois tipos de vírus não podem ser explicadas pelas cargas virais presentes no plasma, uma vez que indivíduos infetados por VIH-2 também evoluem para a fase de SIDA, mesmo quando a carga viral é muito baixa (Nyamweya *et al.*, 2013). A utilização de um grande número de co-recetores pelo VIH-2 deveria representar uma patogenicidade maior, comparativamente ao VIH-1. Portanto, uma explicação pode ser a suscetibilidade do vírus ao controlo pelo sistema imunitário, que no caso do VIH-2 é maior, visto que é mais facilmente sinalizado e neutralizado devido à estrutura e conformação de algumas regiões das glicoproteínas do invólucro (Shi *et al.*, 2005; Nyamweya *et al.*, 2013).

6. Organização estrutural e genómica do vírus

Quando vistos ao microscópio eletrónico, estes vírus apresentam uma forma esférica. Os seus viriões são revestidos por um invólucro, com origem na célula hospedeira, e que é constituído por uma bicamada lipídica com glicoproteínas transmembranares (gp-TM), às quais se encontram ligadas as glicoproteínas de superfície (gp-SU). O invólucro envolve toda a matriz proteica do vírus, que por sua vez rodeia a cápside viral (CA). É dentro da CA que se encontram as enzimas virais necessárias no ciclo de replicação do vírus: a transcriptase reversa (RT), a integrase e a protease. Dentro da CA também estão presentes 4 proteínas acessórias do vírus (*Nef*, *Vif*, *Vpr* e a *Vpu*, no caso do VIH-1 ou a *Vpx*, no caso do VIH-2) e as duas cópias de ARN de cadeia simples, que se encontram ligadas a proteínas da nucleocápside (Turner & Summers, 1999; Freed, 2001; Benjamin *et al.*, 2005). A figura 2 representa um virião de VIH e a sua constituição.

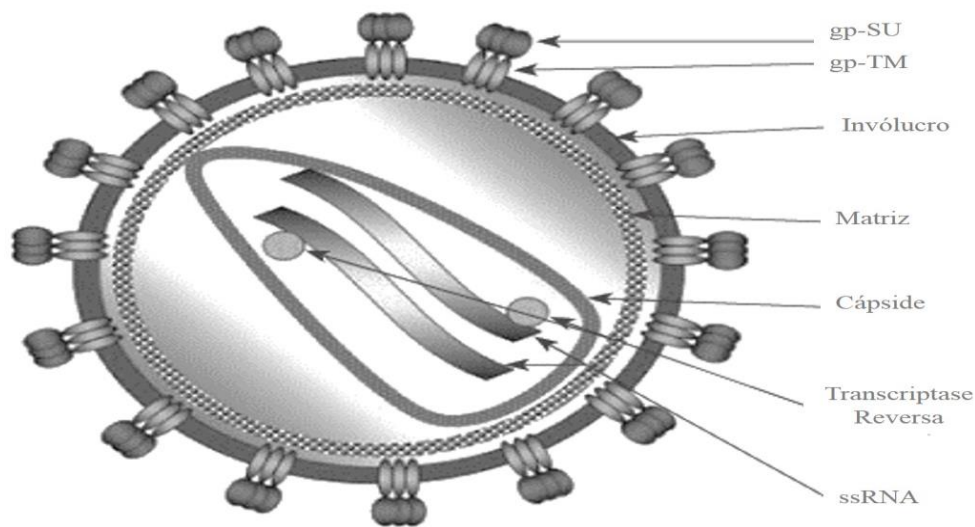
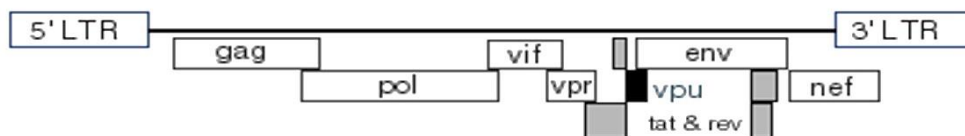


Figura 2: Organização estrutural de uma partícula de VIH (Adaptado de Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

Cada molécula de ARN tem 9 genes que codificam vários tipos de proteínas, sendo que quatro genes codificam as proteínas acessórias já anteriormente referidas, 2 codificam as proteínas de regulação *tat* e *rev* e os outros 3 genes codificam as proteínas de estrutura *gag*, *pol* e *env* (Turner & Summers, 1999; Freed, 2001; Benjamin *et al.*, 2005). O gene *env* codifica uma poliproteína precursora, que ao ser glicolisada no complexo de Golgi e clivada pela protease do vírus, dá origem à glicoproteína do invólucro. Na figura 3 pode ser visto um esquema da organização genómica do VIH-1 e do VIH-2.

VIH-1



VIH-2

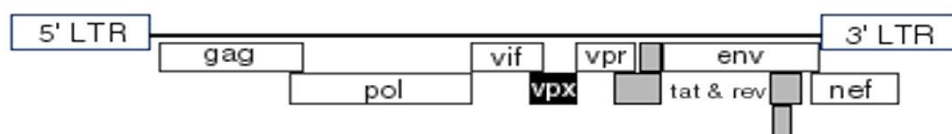


Figura 3: Organização genómica do VIH-1 e do VIH-2 (Adaptado de Los Alamos HIV Database).

6.1. Invólucro viral: constituição e importância

Tal como referido anteriormente, os viriões do VIH têm na sua estrutura um invólucro, que por sua vez é constituído por gp-TM e por gp-SU. Ambos os vírus têm os dois tipos de glicoproteínas, embora sejam diferentes no peso molecular. O VIH-1 tem na sua constituição a gp-SU com 120kDa (gp120) e a gp-TM com 41kDa (gp41), enquanto o VIH-2 é constituído pela gp125 e a gp36 (Borrego & Taveira, 2013). As glicoproteínas são heterodímeros que, após maturação do virião, se encontram associadas como trímeros.

A gp-SU é constituída por cinco regiões hipervariáveis, de V1 a V5 e por cinco regiões conservadas que separam cada uma das regiões hipervariáveis e que são igualmente de C1 a C5 (Turner & Summers, 1999). As regiões hipervariáveis têm como característica a formação de *loops*.

No caso da gp120 do VIH-1, a região V1 e V2 estão separadas por uma ligação dissulfídica, sendo que os respetivos *loops* estão contidos num *loop*, formando assim o domínio V1/V2. Este é bastante variável em termos de tamanho do *loop*, assim como no número de locais de glicosilação. As regiões V3 e V4 também estão separadas por uma ligação dissulfídica. O domínio V3 mas também as regiões C2, C3 e C4 não variam muito em termos de tamanho. As regiões responsáveis pela ligação ao recetor CD4 são as regiões C1, C3 e C4, que têm em si domínios conservadas que são determinantes para a ligação, o que significa que as regiões hipervariáveis não têm um papel direto na ligação ao CD4. No entanto, a região V3 é a responsável pela fusão da membrana e pela seleção do coreceptor a utilizar, e é determinante na neutralização por anticorpos (Checkley *et al.*, 2011). A disposição das regiões constantes e das regiões hipervariáveis da gp120 do VIH-1 é demonstrada na figura 4.

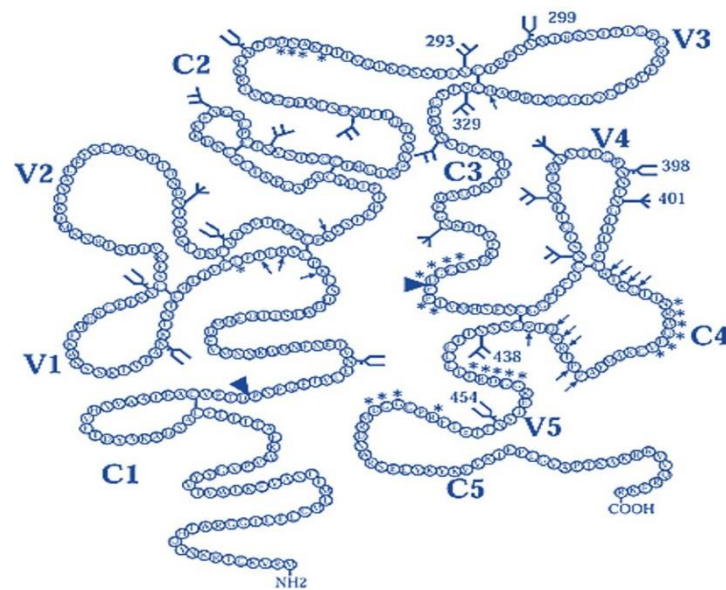


Figura 4: Esquema representativo das regiões hipervariáveis (V1 – V5) e das regiões conservadas (C1 – C5) da gp120 do VIH-1 (adaptado de McCaffrey *et al.*, 2004).

A gp41 é constituída por 3 domínios: um intracitoplasmático, um transmembranar e outro ectodomínio extracelular. É neste último que se encontra o péptido de fusão (Turner & Summers, 1999; Weiss, 2003; Checkley *et al.*, 2011). É dentro do ectodomínio que se encontram os principais determinantes da fusão. Um dos mais conhecidos e estudados é a *Membrane-proximal external region* (MPER), constituída por 24 aminoácidos e necessária para a infetividade do vírus (Checkley *et al.*, 2011).

A figura 5 esquematiza a estrutura primária da poliproteína precursora Env, a gp160, que após clivagem origina a gp120 e a gp41, ambas presentes no invólucro do VIH-1.

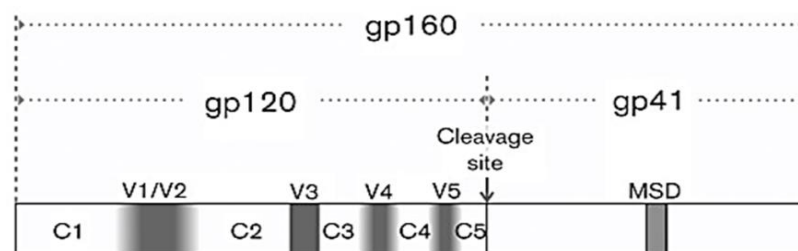


Figura 5: Esquema da estrutura primária da poliproteína precursora Env do VIH-1, que dá origem à gp120 e à gp41 (Adaptado de Steckbeck *et al.*, 2013).

A gp125 do VIH-2 é igualmente constituída por 5 regiões hipervariáveis (V1/V2, V3, V4 e V5) e por 5 regiões conservadas (C1 – C5), com uma estrutura primária semelhante à estrutura do VIH-1. As regiões responsáveis pela ligação entre o vírus e o recetor CD4 são as regiões C2, C3, C4 e V4. A gp36 do VIH-2 é também constituída pelos 3 domínios referidos anteriormente (Taveira, 2014). Na figura 6 podem ser observadas as estruturas conformacionais da gp120 do VIH-1 e da gp125 do VIH-2.

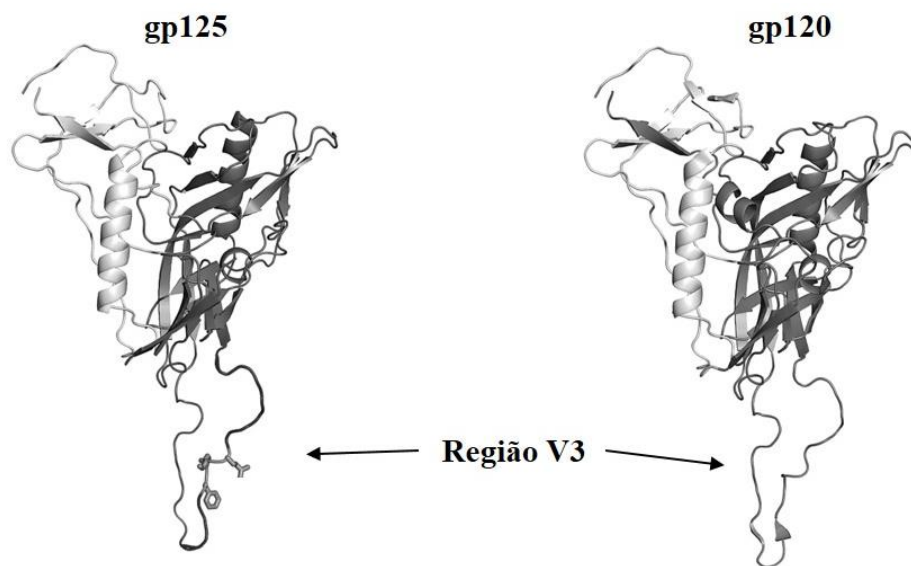


Figura 6: Estrutura conformacional de um monómero da gp125 do VIH-2 e da gp120 do VIH-1 (Adaptado de Uchtenhagen *et al.*, 2011).

É devido à interação entre as glicoproteínas do invólucro e recetores e co-recetores da célula hospedeira que a entrada do vírus acontece e todo o ciclo replicativo se dá (Borrego & Taveira, 2013). Consequentemente, a estrutura e conformação dos vários constituintes do invólucro vão ter um papel fundamental nas respostas imunitárias por parte do indivíduo.

7. Ciclo de replicação viral

A primeira etapa do ciclo acontece após a ligação das glicoproteínas do invólucro aos recetores presentes na superfície das células. A interação das gp-SU acontece de

forma específica e sequencial com o recetor CD4, que pode ser encontrado em vários tipos de células, tais como as células T ou os macrófagos. Após esta primeira ligação, a gp-SU interage também com um co-recetor, havendo mudanças a nível tridimensional gp-TM (Bour *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2005). Como consequência, uma região hidrofóbica desta glicoproteína - denominada de péptido de fusão - fica exposta e é introduzida na membrana citoplasmática da célula, levando à formação de um poro de fusão que permite a entrada da cápside do vírus (Turner & Summers, 1999; Markosyan *et al.*, 2009). Logo de seguida, dá-se a libertação do seu conteúdo no citoplasma da célula e o ARN viral começa a ser transcrito pela RT. Com isto forma-se um complexo de pré-integração constituído por uma cadeia dupla linear de ADN, denominado de ADN proviral, pela proteína Gag da matriz, pela proteína acessória *Vpr* e pela integrase. Este complexo é transportado para o núcleo e por ação da integrase, o ADN proviral é integrado no cromossoma da própria célula, onde vai ser transcrito para ARN viral de vários tipos. Estes são transportados para o exterior do núcleo, sendo que parte pode servir de ARN genómico e a outra parte pode ser traduzida no citoplasma, dando origem às poliproteínas precursoras Gag-Pol e Gag, ou às poliproteínas precursoras Env. As últimas, depois de traduzidas, são glicosiladas no Complexo de Golgi e clivadas, de forma a originarem as gp-TM e as gp-SU. Estas são transportadas para a membrana citoplasmática, onde juntamente com as poliproteínas precursoras Gag-Pol e Gag e com o ARN genómico, vão formar uma nova partícula viral, ainda imatura, que sairá da célula hospedeira, por gemulação. A maturação do virião dá-se por acção da protease, que processa as restantes poliproteínas precursoras e faz com que este se torne numa partícula viral infecciosa (Turner & Summers, 1999; Freed, 2001). A figura 7 resume o ciclo de replicação viral.

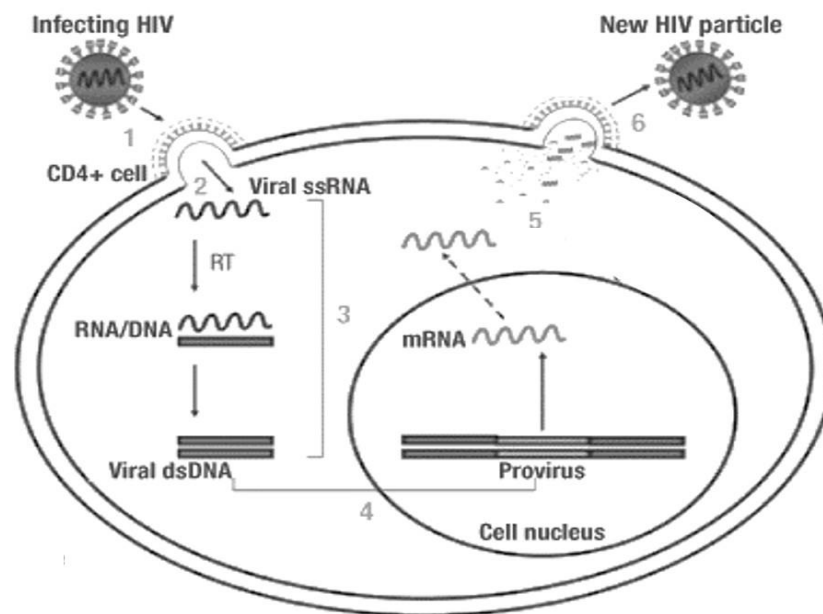


Figura 7: Esquema do ciclo de replicação viral: primeiro dá-se a ligação, fusão e entrada da partícula viral na célula (1). Após a libertação do ARN viral, o mesmo sofre transcrição reversa, dando origem ao ADN proviral (2 e 3), para ser inserido no ADN da célula hospedeira (4). Após a transcrição o ARNm viral é transportado para fora do núcleo e é traduzido no citoplasma, dando origem às proteínas que irão constituir a nova partícula viral (5), que é libertada da célula por gemulação (6) (Adaptado de Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

7.1. Utilização de co-recetores para a entrada do vírus na célula

A utilização de co-recetores é necessária para que o vírus entre na célula hospedeira e ocorra infeção. Os principais co-recetores que participam na entrada na célula são o CCR5 e o CXCR4, quer seja infeção por VIH-1 ou por VIH-2 (Azevedo-Pereira *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2005). A interação entre as glicoproteínas do VIH-1, e o recetor CD4 e o co-recetor, necessária para que haja infeção, pode ser observada na figura 8.

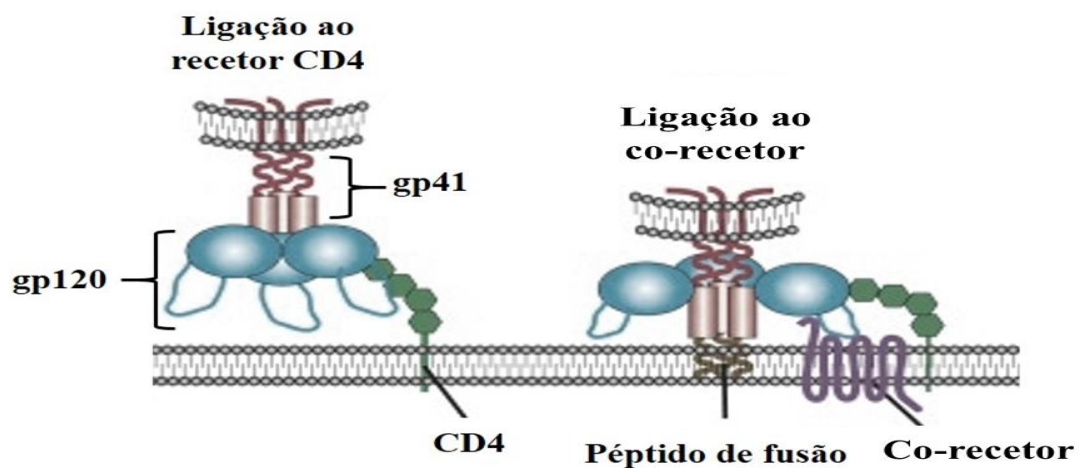


Figura 8: Interação entre as glicoproteínas do VIH-1, o recetor CD4 e o co-recetor (CXCR4 ou CCR5), que permite a entrada do vírus na célula (Adaptado de Wilen *et al.*, 2012).

Quando a infeção é feita pelo VIH-1 encontram-se, maioritariamente, variantes do vírus que utilizam o CCR5 (vírus R5) logo após a transmissão, durante a fase crónica assintomática e também em indivíduos em fase avançada de infeção (Azevedo-Pereira *et al.*, 2003; Santos-Costa *et al.*, 2014). Isto pode ser um indicador de que os vírus R5 escapam melhor às respostas imunitárias ou que estes variantes conseguem infetar células que vão servir de reservatório (Santos-Costa *et al.*, 2014). No entanto, num estado mais avançado da doença, podem surgir variantes do vírus que utilizam preferencialmente o CXCR4 (vírus X4) ou vírus que utilizem ambos os co-recetores (vírus X4R5). Esta mudança está associada a um decréscimo acentuado na contagem de células T CD4 e a uma rápida progressão da doença (Azevedo-Pereira *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005).

No caso de infeção por VIH-2, este pode utilizar o CCR5 numa fase inicial, quando as contagens de células T CD4 ainda são elevadas, mas também pode utilizar alternativamente o CXCR4. Esta mudança foi observada em doentes cujas contagens de células T CD4 se encontravam abaixo de 200 células/ μ L, ou seja, em estado avançado de doença (Shi *et al.*, 2005; Marcelino *et al.*, 2012).

Embora estes sejam os dois co-recetores mais utilizados pelo VIH-1 e pelo VIH-2, alguns isolados conseguem utilizar outros co-recetores *in vitro*. Estes são denominados de alternativos e podem ser os seguintes: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR2, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, XCR1, FPRL1, GPR1, GPR15,

APJ, ChemR23, CXCR7/RDC1, D6, BLTR e BOB (Azevedo-Pereira *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005; Santos-Costa *et al.*, 2014).

Alguns isolados VIH-2 conseguem também infectar células utilizando apenas co-recetores, ou seja, sem utilizar o recetor CD4. Estes são mais facilmente neutralizados pelos anticorpos pois o local de ligação ao co-recetor está mais exposto e é uma região de ligação preferencial por parte de anticorpos neutralizantes (Thomas *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005)

7.2 Interação entre gp-SU e co-recetores

A utilização dos co-recetores é determinada por características presentes em certas regiões das glicoproteínas. No caso do VIH-1, a região V3 da gp-SU é a principal região responsável na seleção do co-recetor a ser utilizado (Hoffman & Doms, 1999). Quando se dá a interação entre a gp120 e o recetor CD4, a região V3 fica mais exposta, o que faz com que seja a mesma a ligar-se aos co-recetores, em particular ao CXCR4 e ao CCR5 (Gorny *et al.*, 2004).

Relativamente ao VIH-2, estudos apontam igualmente para a influência da região V3 na escolha entre CCR5 e CXCR4 (Shi *et al.*, 2005; Visseaux *et al.*, 2012) mas também da região V1/V2 (Santos-Costa *et al.*, 2014). Segundo o que foi observado por Shi e os seus colegas, a região V3 tem uma configuração de mais fácil acesso, quando comparado com o mesmo domínio no VIH-1, o que explica não só a maior sensibilidade à neutralização mas também a capacidade de utilizar co-recetores alternativos (Shi *et al.*, 2005).

8. Respostas imunitárias

8.1. Imunidade inata

Esta é a primeira resposta a acontecer quando ocorre uma infeção pelo VIH. Algumas células, tais como as células dendríticas (do inglês *dendritic cells*, DC), os monócitos, os macrófagos e as *natural killer* (NK), são responsáveis por atuarem nesta fase (Alfano & Poli, 2005; Lehner *et al.*, 2008; Blanchet *et al.*, 2010; Richard & Cohen,

2010; Wilson *et al.*, 2013). As DC mieloides e os monócitos produzem moléculas pró-inflamatórias, tais como as citocinas e as quimiocinas, e participam no recrutamento de células T que vão controlar a replicação viral (Cavaleiro *et al.*, 2013).

Está provado que a resposta imune inata não atua de igual forma, dependendo se a infeção é por VIH-1 ou por VIH-2. Foi demonstrado por Nuvor e seus colegas que os níveis de citotoxicidade das células NK são significativamente mais elevadas em indivíduos infetados por VIH-2, quando a contagem de células T CD4 também é elevada. No entanto, quando há um decréscimo de células T CD4+ devido à progressão da infeção, a citotoxicidade das NK diminui (Nuvor *et al.*, 2006).

Algumas moléculas são responsáveis nesta primeira fase de resposta pelo controlo da replicação viral. As DC exprimem uma proteína, a SAMDH1, que tem a capacidade de bloquear a replicação de alguns retrovírus, tais como o VIH-1. O mesmo não acontece quando a infeção ocorre por VIH-2, já que a sua proteína acessória *Vpx* vai ligar-se a SAMDH1, diminuindo assim a sua capacidade inibitória (Nyamweya *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Outra proteína, a *Tripartite motif protein isoform 5 alpha* (TRIM5α), atua como fator antiretroviral, bloqueando a infeção, antes do estabelecimento do provirus. A replicação do VIH-2 é mais facilmente controlada por esta proteína, comparativamente ao VIH-1 (Ylinen *et al.*, 2005).

8.2. Resposta celular

A resposta celular realizada pelas células T CD4+ é diferente para cada tipo de VIH. No caso de infeção por VIH-1, a quantidade de células T CD4+ produtoras da citocina IL-2 e com capacidade proliferativa diminui. A diminuição da quantidade de IL-2 produzida leva a uma redução da quantidade destas células e a um aumento da apoptose. No caso de infeção crónica e assintomática por VIH-2, o número de células T CD4+ polifuncionais, produtoras de citocinas e com capacidade proliferativa é maior (Duvall *et al.*, 2008). De facto, a produção da citocina IL-2 é maior, o que permite uma maior capacidade de renovação de células T e a diminuição da apoptose celular. O mesmo não é observado numa infeção por VIH-1 em fase crónica (Duvall *et al.*, 2006). Para reforçar esta observação, Gautier e seus colegas concluíram que a restituição de células T CD4+

ocorre mais eficazmente, uma vez que a função tímica é preservada por mais tempo (Gautier *et al.*, 2007).

A resposta imunitária celular realizada pelas células T CD8⁺ também se verifica e a sua capacidade proliferativa e a citotoxicidade associadas às mesmas são semelhantes, quer na infeção por VIH-1 ou por VIH-2 (Duvall *et al.*, 2008). Estas células produzem moléculas efetoras, tais como citocinas (em especial IFN-gama e TNF-alfa) e perforinas. Contudo, a produção das últimas, assim como a citotoxicidade associada a estas células não estão associados ao controlo da virémia do VIH-2, contrariamente ao que acontece numa infeção por VIH-1. O controlo e a baixa carga viral devem-se à produção de várias citocinas e à magnitude da resposta das células T CD8⁺ polifuncionais (Leligdowicz *et al.*, 2007; Duvall *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012).

A quantidade e o desempenho das células T CD4 e das células T CD8 podem ser influenciadas pela atividade imunossupressora que as proteínas do invólucro têm (Cavaleiro *et al.*, 2000). Sabe-se que as proteínas do invólucro do VIH-2 vão fazer com que não haja ativação das células, através da interação com os monócitos. Assim a depleção das células T é menor e isso faz com que a progressão da doença aconteça mais lentamente (Cavaleiro *et al.*, 2007).

A atividade e quantidade de células T é igualmente influenciada pelas células B reguladoras (do inglês *regulatory B cells*, Bregs). Estas conseguem controlar a proliferação das células T CD4⁺ e influenciam a atividade citotóxica das células T, medida pelas células T CD8⁺ (Siewe *et al.*, 2014).

8.3. Resposta humoral

8.3.1. Anticorpos Neutralizantes

Os anticorpos neutralizantes (do inglês *neutralizing antibodies*, nAbs) são proteínas que se ligam a regiões específicas das glicoproteínas do invólucro, gp-SU ou gp-TM, e que impedem a entrada do vírus na célula.

Os nAbs autólogos são mais comuns numa infeção por VIH-2 (Bjorling *et al.*, 1993). Os mesmos são produzidos quando a infeção ocorre por VIH-1, no entanto este

vírus tem a capacidade de escapar à neutralização numa fase inicial da infeção, através da seleção de variantes resistentes (Wei *et al.*, 2003; Bunnik *et al.*, 2010). Shi e seus colegas concluíram também que não existe associação entre neutralização e preferência na utilização de co-recetor, embora tenham observado que a maioria dos isolados R5 eram sensíveis à neutralização autóloga. A resposta dada por nAbs heterólogos é igualmente diferente, já que é de grande amplitude numa infeção por VIH-2 (Shi *et al.*, 2005). Estudos realizados anteriormente demonstram que vírus primários isolados de indivíduos com infeção crónica por VIH-2 são mais suscetíveis à neutralização. Esta suscetibilidade não se observa em vírus primários isolados de indivíduos infetados com VIH-1 (Kong *et al.*, 2012; Ozkaya *et al.*, 2012; de Silva *et al.*, 2012). Também não foi encontrada associação entre a neutralização heteróloga e a escolha na utilização de co-recetor (Shi *et al.*, 2005). No caso de infeção por VIH-1, nAbs heterólogos são encontrados em indivíduos considerados *long-term non-progressor* (Pilgrim *et al.*, 1997). Em termos de respostas cruzadas, Weiss e os seus colegas demonstraram que os nAbs contra VIH-2 conseguem neutralizar VIH-1 mas o contrário não se observa (Weiss *et al.*, 1988).

A sensibilidade à neutralização por anticorpos pode estar relacionada com a forma como certos epitopos são apresentados, o que depende se o vírus é R5 ou X4. Os vírus X4 são mais sensíveis à neutralização comparativamente aos vírus R5, no caso de infeção por VIH-1 (Bunnik *et al.*, 2007). O mesmo não se verifica numa infeção por VIH-2, já que foi observado que os vírus R5 são mais sensíveis e o vírus X4 mais resistentes à neutralização (Marcelino *et al.*, 2010). A potência e amplitude da resposta dada pelos nAbs depende do número de células T CD4⁺ presentes no plasma dos doentes, sendo que a sua diminuição e progressão para doença tinham como consequência a diminuição da atividade dos nAbs. Também foi demonstrado que alguns doentes infetados com VIH-2, numa fase crónica de doença, conseguem produzir nAbs autólogos. No entanto, a maioria dos indivíduos produzem nAbs heterólogos (Marcelino *et al.*, 2012).

8.3.2. Determinantes da neutralização

Quando ocorre uma infeção por VIH-1, os anticorpos vão atuar contra epitopos ou regiões específicas das glicoproteínas do invólucro, tais como o *loop* da região V1/V2, o *loop* da região V3, o local de ligação das células CD4 ou a MPER da gp41 (Huang *et*

al., 2014). Esta última região é bastante conservada e é por isso um dos alvos preferenciais dos anticorpos neutralizantes (Checkley *et al.*, 2011). No entanto, o vírus consegue escapar aos anticorpos neutralizantes através de uma série de estratégias tais como, a variação nas sequências nucleotídicas, alterações conformacionais ou adição de glicanos (Bunnik *et al.*, 2010). Um exemplo é o aumento do tamanho do *loop* do domínio V1/V2 e do número de locais de glicosilação que promovem o escape à neutralização, o que pode ser correlacionado com a progressão da doença (Checkley *et al.*, 2011).

No caso do VIH-2, foram descritos alguns epitopos alvo dos anticorpos neutralizantes, presentes na região terminal COOH da gp41 e nas regiões V1, V2, V4 e C5 na gp125, assim como a região V3 (McKnight *et al.*, 1996; Marcelino *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2012; de Silva *et al.*, 2012).

8.3.2.1. Região V3 da gp-SU

Estudos anteriores demonstraram que esta região, com estrutura e conformação em *loop*, é responsável não só na escolha do co-recetor a ser utilizado durante a ligação do vírus à célula mas também na indução de nAbs (Shi *et al.*, 2005; Borrego *et al.*, 2008; Visseaux *et al.*, 2011). A região V3 do VIH-2 é rodeada pelas regiões C2 e C3, tal como acontece com o VIH-1. Foi observado que nAbs do tipo IgG têm como alvo preferencial a região C2V3C3. Isto não significa que estes anticorpos neutralizem por si o vírus mas podem servir de sinalização para que outros anticorpos específicos para outras regiões atuem em conjunto (Marcelino *et al.*, 2012).

Estudos com anticorpos monoclonais (do inglês *Monoclonal Antibodies*, mAbs) permitiram perceber que os mesmos tinham capacidade de neutralizar isolados primários de VIH-1, tendo como alvo epitopos conformacionais presentes na região V3 (Conley *et al.*, 1994; Krachmarov *et al.*, 2006). O mesmo foi provado para a neutralização do VIH-2, isto é, que mAbs conseguiam neutralizar isolados de VIH-2, através do reconhecimento de epitopos conformacionais dentro da região V3 (Björling *et al.*, 1994; McKnight *et al.*, 1998). Estudos realizados sobre a neutralização do VIH-2 com fragmentos de um anticorpo (do inglês *Fragment antigen binding*, Fab) monoclonal anti-V3 do VIH-2 permitiram perceber como pode ser feito o bloqueio da infeção *in vitro* de isolados VIH-

2 e, consequentemente, como o vírus pode ser neutralizado (Sourial & Nilsson, 2008; Uchtenhagen *et al.*, 2011). A figura 9 mostra a ligação entre um Fab anti-V3 do VIH-2 e a gp125.

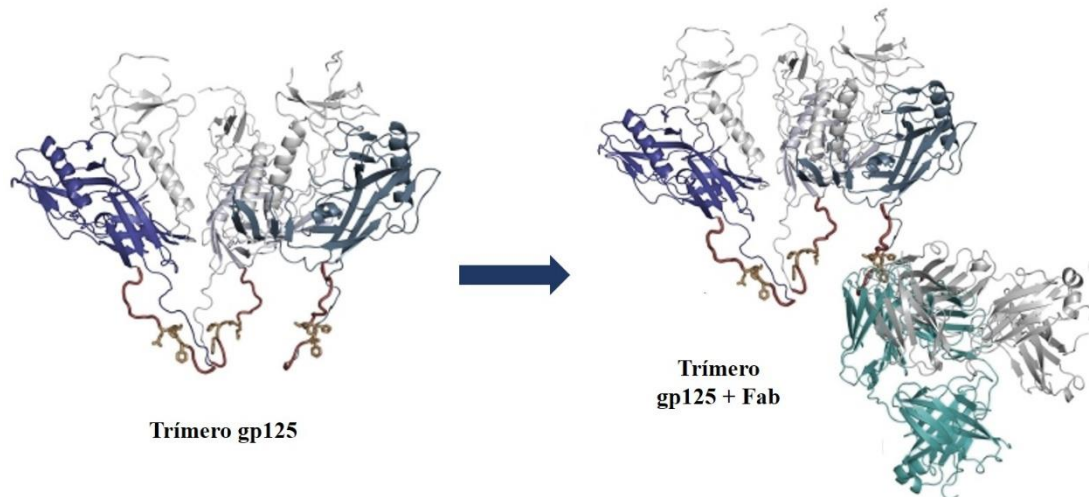


Figura 9: Estrutura conformacional em trímero da gp125 e a ligação de um Fab anti-V3 do VIH-2 (Adaptado de Uchtenhagen *et al.*, 2011).

Porém, e embora a região V3 seja a responsável pela sensibilidade à neutralização em ambos os vírus, a resposta dada por anticorpos neutralizantes não é igual para os dois tipos de vírus, sendo que o VIH-2 é mais facilmente neutralizado do que o VIH-1 (Chauveau *et al.*, 2015). Este último tem uma maior capacidade de escapar à neutralização e uma das explicações para este fenómeno é a mudança no padrão de glicosilação da glicoproteína, já que os potenciais locais de glicosilação na região V3 do VIH-1 são 4 a 5, ou seja, em maior número do que para a mesma região do VIH-2, que são 2 a 3 (Shi *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2003). Estudos anteriores permitiram observar que o número de locais de glicosilação variavam na região C2V3C3, estando mais concentrados na região C2 (tal como acontece na região correspondente no VIH-1) e sendo mais conservados na região C2 e na região V3. A maior variação ao longo do tempo observou-se na região C3. Logo, a sensibilidade à neutralização do VIH-2 não se deve ao padrão de glicosilação (Borrego *et al.*, 2008) mas pode dever-se ao facto de a região V3 ser mais acessível e menos variável, comparativamente à região V3 do VIH-1 (Uchtenhagen *et al.*, 2011).

Enquadramento e objetivos do estudo

Tal como foi dito anteriormente, os anticorpos neutralizantes têm a capacidade de inibir a entrada do vírus nas células, contribuindo assim para o controlo da replicação viral. O seu alvo preferencial é a região V3 do domínio C2V3C3 existente na gp125 do VIH-2. No entanto, desconhece-se ainda de que forma as regiões C2 e C3, contribuem para a indução de uma neutralização eficaz.

Foi observado em um estudo anterior que as regiões C2 e C3 encontram-se bastante expostas no invólucro e podem conter em si epitopos neutralizáveis. Tal como acontece no VIH-1, as regiões C2 e C3 do VIH-2 são as mais variáveis no que toca à diversidade de aminoácidos (Barroso *et al.*, 2011). Logo, é importante perceber qual o papel de cada uma das regiões do domínio C2V3C3 da gp125 na indução de uma resposta neutralizante, o que poderia permitir o desenvolvimento de uma vacina, através da produção de péptidos sintéticos.

Portanto, o principal objetivo deste estudo foi caracterizar a resposta de anticorpos não neutralizantes e neutralizantes contra as regiões C2, V3 e C3. Para isso, foram traçados objetivos específicos, sendo eles: clonar os fragmentos de ADN de cada região em vetores plasmídicos; transformar bactérias competentes para produzir os péptidos recombinantes correspondentes a cada uma das regiões; purificar os péptidos recombinantes e analisar a antigenicidade destas regiões com um painel de soros de doentes seropositivos para VIH-2, com recurso a um ensaio imunoenzimático.

II. Material e métodos

1. Origem e descrição do vetor plasmídico

O vetor plasmídico foi construído de forma a conter a região C2V3C3 do gene *env* do VIH-2, para transformação em bactérias competentes *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP 10 (Invitrogen™, Estados Unidos da América (EUA)), como descrito anteriormente (Marcelino *et al.*, 2005). O plasmídio gerado foi denominado de pTrcC2-C3.

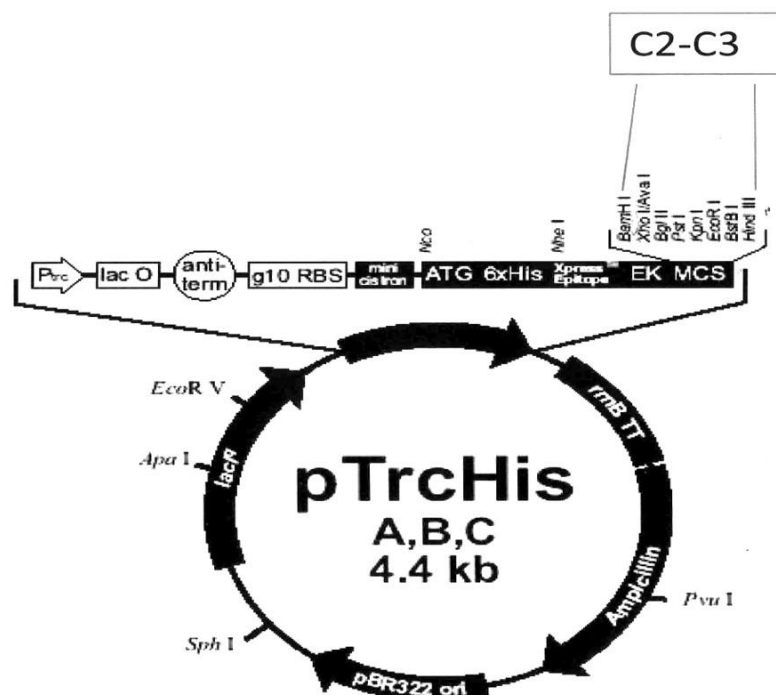


Figura 10: Esquema detalhado sobre o vetor pTrcHis e as suas características. O local de inserção do fragmento C2V3C3 encontra-se assinalado na figura (Adaptado do manual do fabricante).

Tal como a figura 10 demonstra, a região C2V3C3 do gene *env* do VIH-2 foi clonada num vetor plasmídico denominado de pTrcHis (Invitrogen™, EUA). Este tipo de vetores foi desenvolvido para que a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* seja mais eficiente, assim como a sua purificação. Das muitas características destes vetores, uma das mais importantes é a cópia do gene *lacI^q* que ao codificar o repressor *lac* permite um controlo da transcrição do fragmento clonado. Isto significa que se pode induzir a expressão da proteína recombinante após adição de Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

(IPTG) ao meio de crescimento bacteriano. De igual importância é o gene de resistência à ampicilina, que permite a seleção dos clones bacterianos. Outra característica é o fragmento de 6xHis, responsável pela formação de uma cauda de poli-histidinas que auxilia no processo de purificação das proteínas recombinantes.

2. Extração de ADN plasmídico

Numa primeira fase, foi necessário fazer a seleção dos clones bacterianos recombinantes. Para isso, colocou-se meio LB-Agar (Anexo 1), suplementado com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Alemanha), em placas de Petri, para isolamento das colónias bacterianas de interesse. As placas foram colocadas a incubar a 37°C, durante a noite (do inglês *overnight*, ON). As colónias foram repicadas e inoculadas em meio LB líquido (Anexo 1), igualmente suplementado com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Alemanha), em agitador orbital, a 37°C, 250 rpm, ON.

A extração foi realizada com recurso ao kit comercial *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, recolheu-se o *pellet* de 1 mL da cultura líquida preparada anteriormente, após centrifugação (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 12000 g, durante 1 minuto. O *pellet* foi completamente ressuscitado com 200 µL de solução de ressuspensão e homogeneizado no vórtex. De seguida, fez-se a lise celular com a solução de lise e misturou-se por inversão até a mistura ter um aspecto viscoso. Após 5 minutos, neutralizou-se com 350 µL de solução de neutralização, misturou-se por inversão 4 a 6 vezes e centrifugou-se (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 12000 g, durante 10 minutos. O objetivo foi obter um lisado neutralizado, que foi transferido para uma coluna previamente preparada (a preparação da coluna fez-se num tubo de microcentrífuga, com adição de 500 µL de solução de preparação da coluna, seguida de centrifugação (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 12000 g, durante 1 minuto, e descarte de sobrenadante). Após a transferência, foi feita uma centrifugação (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 12000 g, durante 1 minuto. A lavagem da coluna foi feita com a adição de 750 µL de solução de lavagem diluída, seguida de centrifugação (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 12000 g, durante 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e procedeu-se a nova centrifugação (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 12000 g, durante 2 minutos. Por fim, procedeu-se à eluição do ADN plasmídico. Transferiu-se

a coluna para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se 100 µL de solução de eluição. Centrifugou-se (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 12000 g, durante 1 minuto. O ADN plasmídico eluído, que serviu de molde para a amplificação da região C2V3C3, foi quantificado com o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A visualização do ADN plasmídico fez-se por eletroforese em minigel de agarose (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 1% (p/v), em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (Anexo 1), com adição de brometo de etídio (1:20000, *stock* 10%). A amostra foi aplicada no gel, após mistura de 15 µL de ADN com 5 µL de *loading dye* 6X (Fermentas, Canadá). Foi também aplicado um marcador molecular (MM) *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, Canadá), para comparação dos tamanhos dos fragmentos, após migração no gel. A voltagem utilizada foi de 80V, durante 30 minutos. Todos os fragmentos obtidos foram visualizados com recurso a radiação ultravioleta.

3. Origem e preparação dos *primers*

A sequência do gene *env* do VIH-2 pode ser encontrada na base de dados *GenBank®*, com *Acession Number* L25445.1. O gene *env* contém a região C2V3C3, tal como assinalado na figura 11.

```

>gi|517051|gb|L25445.1|HIV2ENVB Human immunodeficiency virus type 2
proviral envelope glycoprotein (env) gene, complete cds
ATGATGTCTAGTAGAAATCAGCTGCTTGTACTATCTTACTAGCTAGTGCTTGCTTAGTATATTGTA AAC
AATATGTGACTGTTTTTTATGGCGTGCCAGCATGGAAAAATGCATCCATTCCCCTCTTTTGTGCAACCAA
AAATAGAGATACTTGGGGAACCATACAGTGCTTACCAGACAATGATGATTATCAGGAAATAGCTTTAAAT
GTGACAGAGGCTTTTCGATGCATGGGATAATACAGTAACAGAACAAGCAGTAGAAGATGTCTGGAGACTAT
TTGAGACATCAATAAAACCATGTGTCAAGTTAACACCTTTATGTATAGCAATGAAGTGTAGCAACATAAG
CACAGAGAGCACAAACCACATCCCCGAGCCCAGGGAGCACACTCAAACCCCTGATAAATGAGAGCGATCCA
TGCATAAAGGCAGACAACCTGCCCCAGGGGACTAGGGGATGAAGAGATGGTCAATTGTCTGGTTCAACATGA
CAGGATTACAGAGAGATAAGCCAAAACAGTATAATGAAACATGGTACTCAAAAGATGTGGTTTGTGAACC
ATTTAACACCACCACAAACCAGACCAGGTGTTACATGAACCATTGCAACACATCAGTCATCACAGAGTCA
TGTGATAAGCACTATTGGGATGCTATAAGATTTAGATACTGTGCACCACCTGGTTACGCCTTGCTAAGAT
GCAATGATACCAATTATTAGGCTTTGCACCCAATTGCTCTAAAGTAGTAGCTGCTACATGCACAAGGAT
GATGGAGATGCAAACCTTCTACTTGGTGGTTTAAATGGTACTAGGGCAGAAAATAGAAATATAATTA
GGTAAAGTATAGAGATAATAGAACTATCATCAGCTTAAACAAAACAGTATAATCTTACTATGTAATGTAAGA
GGCCAGGAAATAAGACAGTTGTACCAATAACACTTATGTCAGGGTTAATATTTCACTCCAGCCCAATCAA
TAAAAGACCCAGACAAGCATGGTGCTGGTTCAAAGGCGAATGGAGGGAAGCCATGCAGGAGGTGAAGGAA
ACCCTTGTA AAACATCCCAGGTATAAAGGAACCAATGACACAAACCAAATTAACCTTTACAAAACCCAGGAA
GAGGCTCAGATGCAGAAGAGGTATATATGTGGACTAACTGCAGAGGAGAATTTCTCTATTGCAACATGAC
TTGGTTCTCTCAATTGGGTGGAACAAAACGGGTCAGGAACAGCACAATTATGCACCGTGCCATATAAAG
CAAATAATTAATACCTGGCACAAGTAGGGAAAAATGTATATTTGCCTCCTAGGGAAGGAGAGTTGACCT
GCAACTCAACAGTAACCAGCTTGATTGCTAACATTGACACGGATGGCAACCAGACAAATATTACCTTTAG
TGCAGAGGTGGCAGAGCTATACCGATTAGAATTGGGGGATTATAAATTAGTAGAGATAACACCAATTGGC
TTCGCACCTACATCAGAAAGGAGATACTCCTCTACTCCAAGGAGGAATAAAAGAGGTGTGTTTCGTGCTAG
GGCTCTTGGGTTTTCTCGCGACAGCAGGTTCTGCAATGGGCACGGCAGCTTTAACGCTGTCTGCTCAGTC
TCGGACTTTATTGGCCGGGATAGTGCAGCAACAGCAACAGCTGTTGGACATGGTCAAGAGACAACAGGAA
ATGTTGCGACTGACCGTCTGGGGAACGAAAAATCTCCAGGCAAGAGTCACTGCTATCGAGAAATACTTAA
AGGACCAGGCGCGGCTAAATTCATGGGGATGTGCATTTAGACAAGTCTGCCACACTACTGTACCATGGGT
AAATAACTCCTTAAACCTGATTGGGACAACATGACGTGGCAAGAGTGGGAACAACAAGTCCGTTACCTA
GAGGCAAAATATCAGTGAACAGTTAGAACAGGCACAAATTCAGCAAGAAAAGAATACATATGAACTACAAA
AATTAAATAGCTGGGATGTTTTTACCAACTGGCTTGACTTAACCGCTGGGTCAAGTATATTCAATATGG
AGTTTATATAATAGTAGGAATAGTAGCTCTTAGAATAGTAATATATGTAGTGCAAATGTTAAGTAGGCTC
AGGAAGGGCTATAGGCCTGTTTTCTCCTCCCCTCCCGTTACATCCAACAGATCCATATCCACAAGGACC
AGGAACAGCCAACCAGAGGAGAAACAGAAGAAGACGTTGGAGACAACGTTGGGGACAGATTGTGGCCCTG
GCCGATCGCATATTTACATTTCTGATCCACCTGCTAGCTCGCCTCTTGATCGGGCTGTACAGCATCTGC
AGGGACTTACTATCCAGGATCTTCTCGATCCTCCAACCGATCTTCCAGAGTCTTCCAGAGAGCGCTGACAA
CAATCAGGGACTGGCTGAGACTTAAAGCAGCCTACCTGCAGTATGGGTGCGAGTGGATCCAAGAAGCGTT
CCAGGCCCTTTGCAAGGATTGCGAGAGAGACGCTTACAAACACCTGGAGAGACTTGTGGGGGGCAATGCAG
TGGGTCTGGGAGGAGGATACTCGCAGTCCCAAGGAGGATCAGGCAGGGGGCAGAAATTGCCCTCCTGTGA

```

Figura 11: Sequência nucleotídica do gene *env* do VIH-2. As regiões C2, V3 e C3 encontram-se sublinhadas a verde, a amarelo e a cinzento, respetivamente.

A região C2V3C3 tem início no nucleótido 796 e termina no nucleótido 1164. Marcada a verde, está a região C2 compreendida entre o nucleótido 796 até ao 903, que corresponde a 36 aminoácidos (aa). A região V3, assinalada a amarelo, inicia-se no nucleótido 904 e termina no nucleótido 1020, correspondente a 39 aa. Por fim, a cinzento, encontra-se a região C3, com início no nucleótido 1021 e término no nucleótido 1164, o que corresponde a 48 aa.

Os *primers* (Stabvida, Portugal) foram selecionados com base nas sequências conhecidas para cada uma das regiões descritas anteriormente e nas sequências para os locais de corte das enzimas de restrição Bam HI e HindIII. Este último pormenor é muito importante pois é o que permite que cada fragmento seja clonado exatamente dentro do *Multiple Cloning Site* (MCS) do vetor plasmídico, que é cortado pelas enzimas de restrição anteriormente referidas. A elaboração e seleção dos *primers* adequados foram feitas com recurso ao *software* Primer 3 (Koressaar & Remm, 2007; Untergrasser *et al.*, 2012).

Tabela 1: Caracterização dos *primers* utilizados na amplificação de ADN por PCR.

Região amplificada	Nome do <i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	Tm (°C)
C2	C2F	AAA AGG ATC CTT TGG CTT TAA TGG CAC TAG GG	61.9
	C2R	GGG CAA GCT TAT GCA TAG TAA GAT TAT ACT GT	58.2
V3	V3F	ACA GGA TCC TGT AAG AGG CCA GGA AAT AAG	60.9
	V3R	TGC AAG CTT TTC GCC TTT GAA CCA GCA CCA	66.0
C3	C3F	AAA GGA TCC TGG AGG GAA GCC ATG CAG	64.1
	C3R	CTC AAG CTT TCT GCA GTT AGT CCA CAT ATA TAC	58.3
C2V3C3	C2V3C3F	AAT GGC ACT AGG GCA GAA A	54.2
	C2V3C3R	CTG CAT CTG AGC CTC TTC CT	56.7

Os liofilizados dos *primers* foram hidratados com *Nuclease-free water* (QIAGEN, Alemanha), para uma concentração de 100 µM. Estes *stocks* serviram para fazer alíquotas de trabalho, por diluição também com *Nuclease-free water* (QIAGEN, Alemanha), com concentração final de 20 µM, que foram mantidas a -20°C.

4. Amplificação de regiões do gene *env* do VIH-2

O ADN das regiões C2, V3 e C3 foi amplificado, respetivamente, por Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*, PCR). O ADN da região C2V3C3 foi também amplificada para servir de controlo. O PCR foi realizado com recurso a um termociclador GenPro (Bioer Technologies, China). As condições para a amplificação são descritas na tabela 2:

Tabela 2: Condições utilizadas durante o PCR para a amplificação do ADN das regiões C2, V3 e C3. As mesmas condições foram utilizadas para a amplificação do ADN do domínio C2V3C3.

Etapas	Condições
Desnaturação	95°C, 5 minutos
Amplificação	95°C, 30 segundos; 56°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos (30 ciclos)
Extensão	72°C, 5 minutos
Manutenção	4°C, ∞

Para cada região a amplificar foi feita uma mistura de PCR que continha 10 µL de *GoTaq® buffer 5X* (Promega, EUA), 0,50 µL de *GoTaq® DNA polymerase* (5U/µl) (Promega, EUA), 1,5 µL de *dNTP Mix* 10mM (Promega, EUA), 1,5 µL de ADN plasmídico, 0,50 µL de *primer forward* e 0,50 µL de *primer reverse* (específicos para cada região a amplificar), e *Nuclease-free water* (QIAGEN, Alemanha) até perfazer um volume final de 50 µL.

Para garantir que os produtos de PCR estavam a ser amplificados de forma específica, foi feita eletroforese em minigel de agarose a 1% (p/v), nas condições descritas anteriormente. Foi feita uma mistura para cada fragmento amplificado, com 15 µL de ADN e 5 µL de *loading dye 6X* (Fermentas, Canadá). O MM aplicado foi o *Mass Ruler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas, Canadá). A voltagem utilizada foi novamente de 80V mas durante 1h30. Todos os fragmentos obtidos foram visualizados com recurso a radiação ultravioleta.

5. Purificação dos produtos de PCR

Esta etapa foi feita com recurso ao *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Inglaterra). Este kit permite purificar ADN de soluções ou reações enzimáticas mas também de géis de agarose. Neste caso, foi seguido o protocolo para a primeira opção, segundo as instruções do fabricante. Em suma, foi adicionado o *Capture buffer type 3* a cada amostra de ADN, numa proporção de 1:5. Misturou-se e centrifugou-se (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha). Por cada purificação a fazer, foi colocada uma coluna *GFX MicroSpin* dentro de um tubo coletor.

A mistura anterior foi carregada na coluna, que foi a centrifugar (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha), ainda no tubo coletor, durante 30 segundos, a 16000 g. O sobrenadante presente no tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 500 µL de *Wash buffer type 1* à coluna, que foi novamente a centrifugar (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha), juntamente com o tubo coletor, a 16000 g, durante 30 segundos. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi colocada em um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (*DNAse-free*). A eluição foi feita por adição de 50 µL de *Elution buffer type 4* no centro da membrana da coluna e subsequente incubação a temperatura ambiente, durante 1 minuto. Centrifugou-se (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a coluna juntamente com o tubo, a 16000 g, durante 1 minuto, para recuperação do ADN purificado. O ADN purificado foi finalmente quantificado com o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

6. Digestão dupla enzimática

Dadas as características dos *primers* desenhados, todos os produtos amplificados continham não só cada região de interesse (C2, V3, C3 e C2V3C3, respetivamente), mas também sequências para os locais de corte das enzimas de restrição Bam HI e Hind III. Ao fazer a digestão dupla com estas enzimas, o ADN amplificado passou a ter extremidades coesivas, essenciais para o passo de clonagem no vetor plasmídico.

A digestão dupla das regiões C2, V3 e C3 foi realizada após preparação de misturas de reação, contendo cada uma 30 µL de ADN, 4 µL de *Buffer RED 10X* (Fermentas, Canadá), 1,5 µL de Hind III (Fermentas, Canadá), 2,5 µL de Bam HI (Fermentas, Canadá) e 2 µL de *Nuclease-free water* (QIAGEN, Alemanha), num volume final de 40 µL. Para controlar a eficiência da digestão dupla, foi preparado um tubo adicional com ADN plasmídico contendo a região C2V3C3. Esta reação foi preparada num volume final de 40 µL, com as mesmas quantidades de enzima e de tampão, mas com apenas 25 µL de ADN e 7 µL de *Nuclease-free water* (QIAGEN, Alemanha). Todos os tubos foram incubados em estufa a 37°C, durante 2h.

7. Purificação dos produtos de digestão

A purificação do ADN obtido por digestão dupla foi feita por precipitação com etanol absoluto. Para cada fragmento de ADN das várias regiões foi preparado um tubo com 30 µL de ADN, com 70 µL de *Nuclease-free water* (QIAGEN, Alemanha). A cada um foi adicionado 100 µL de uma mistura de fenol/clorofórmio. Todos os tubos foram ao vórtex durante 1 minuto. Depois todos os tubos foram a centrifugar (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) durante 5 minutos a velocidade máxima, para posterior remoção do sobrenadante para novos tubos. A estes foram adicionados 200 µL de etanol a 100%. Depois de misturados no vórtex, os tubos foram armazenados a -20°C, ON. No dia seguinte e depois de retirados do congelador, os tubos foram sujeitos a centrifugação a velocidade máxima (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha), durante meia hora, a 4°C. Removeram-se os sobrenadantes e foram adicionados 100 µL de etanol a 70% ao *pellet* de cada tubo. Procedeu-se a nova centrifugação (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha), durante 10 minutos, 4°C, a velocidade máxima. Removeram-se os sobrenadantes e deixaram-se os tubos abertos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Adicionou-se *Nuclease-free water* (QIAGEN, Alemanha) a cada tubo e ressuspendeu-se. Todo o ADN obtido e purificado foi quantificado com recurso ao espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

8. Clonagem dos fragmentos de ADN obtidos por PCR no vetor

8.1. Obtenção do vetor a partir do gel de agarose

O vetor utilizado nas clonagens teve origem no vetor plasmídico inicial, o pTrcC2-C3. Após extração do ADN plasmídico, como descrito anteriormente, fez-se nova digestão dupla com as enzimas de restrição Bam HI e Hind III, para obter o vetor sem a região C2V3C3, que serviu para fazer a ligação dos fragmentos de ADN obtidos anteriormente por amplificação e digestão enzimática.

Para isso adicionou-se num tubo 2 µL de tampão de eluição (o mesmo tampão que foi utilizado na eluição do ADN plasmídico durante a Miniprep), 4 µL de *Buffer RED* 10X (Fermentas, Canadá), 1,5 µL de Hind III (Fermentas, Canadá) e 2,5 µL de Bam HI (Fermentas, Canadá), e por fim, 30 µL de ADN plasmídico. A reação ocorreu durante

2h30, e depois foi adicionado 1 μ L de *Calf-Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP; Fermentas, Canadá), tendo-se deixado a mesma a decorrer mais 30 minutos.

A confirmação dos produtos de reação foi obtida por eletroforese em minigel de agarose a 1%, nas condições descritas anteriormente. Foi preparada uma mistura com 5 μ L de ADN e 3 μ L de *loading dye* 6X (Fermentas, Canadá), para confirmação da obtenção dos produtos de digestão. Após a observação de duas bandas no gel, procedeu-se a nova eletroforese, desta vez em gel de agarose a 0,8% (gel preparativo) e nas condições anteriormente utilizadas. Foi preparada uma mistura com 35 μ L de ADN digerido e 8 μ L de *loading dye* 6X (Fermentas, Canadá). O MM aplicado foi o *Mass Ruler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas, Canadá). Depois de observado sob radiação ultravioleta e identificado o fragmento de ADN desejado, o mesmo foi purificado com recurso ao *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Inglaterra) que, como já tinha sido referido anteriormente, permite purificar ADN proveniente de géis de agarose. Em resumo, pesou-se um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL *DNase-free* e registou-se o peso. Utilizando um bisturi estéril e com auxílio de radiação ultravioleta, cortou-se a banda do gel de agarose que continha o fragmento desejado e colocou-se no tubo. Pesou-se novamente o tubo e calculou-se a massa de agarose. Adicionou-se 300 μ L de *Capture buffer type 3*, misturou-se por inversão e incubou-se a 60°C, durante 15 a 30 minutos, até a agarose estar completamente dissolvida. A cada 3 minutos de incubação procedeu-se a nova mistura por inversão. Após dissolução da agarose, a mistura foi sujeita a centrifugação (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha). Colocou-se uma coluna *GFX Micro Spin* em um tubo coletor. Adicionou-se a mistura anterior à coluna e incubou-se a temperatura ambiente, durante 1 minuto. A coluna e o tubo foram centrifugados a 16000 g, durante 30 segundos (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante presente no tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 500 μ L de *Wash buffer type 1* à coluna e mesma foi centrifugada, juntamente com o tubo coletor, durante 30 segundos, a 16000 g (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha). O tubo coletor foi descartado e a coluna foi colocada em novo tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 50 μ L de *Elution buffer type 4* no centro da membrana da coluna e incubou-se a temperatura ambiente, durante 1 minuto. A coluna e o tubo foram centrifugados (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 16000 g,

durante 1 minuto, para recuperação do ADN purificado. A sua concentração foi obtida por leitura em espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

8.2. Ligação dos produtos de PCR ao vetor plasmídico e transformação bacteriana das ligações

Foi feita uma mistura de reação para cada fragmento de ADN das regiões C2, V3 e C3, respetivamente. Foi feita também uma mistura em que foi colocado o vetor sem fragmento de ADN a ligar, para controlar a sua capacidade de re-ligação. A tabela 3 mostra o que foi colocado em cada tubo.

Tabela 3: Descrição das misturas de reação utilizadas na clonagem.

	Quantidades de Reagentes (µL)					
	Vetor	Fragmento (ADN)	Ligase buffer	T4 Ligase	Tris buffer 10 mM pH8	
C2	1	3	2	2	12	Volume final de 20 µL
V3	1	1	2	2	14	
C3	1	2	2	2	13	
Vetor	1	0	2	2	15	

Todos os tubos foram colocados durante 2h a temperatura ambiente. Metade do volume de cada ligação foi depois utilizado para transformar bactérias competentes em novos tubos, que foram colocados durante meia hora em gelo. Para haver choque térmico, os mesmos foram colocados a 42°C, durante 45 segundos e, logo de seguida, em gelo, durante 1 minuto. Adicionaram-se 950 µL de LB líquido (Anexo 1) aos tubos, sendo que os mesmos foram colocados depois a incubar durante 1 hora, em agitador, a 37°C, a 250 rpm. Após a incubação, os tubos foram sujeitos a centrifugação (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha) a 8000 rpm, durante 5 minutos. Removeram-se 800 µL de sobrenadante de cada tubo e os respetivos *pellets* foram ressuspensos no excedente do sobrenadante. Cada produto da ressuspensão foi plaqueado em placas de Petri com meio LB-Agar (Anexo 1), suplementado com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich,

Alemanha) que permite a seleção de clones recombinantes. As mesmas foram incubadas a 37°C, ON.

Na manhã seguinte, as colónias presentes nas placas foram repicadas separadamente e inoculadas em 10 mL de meio LB líquido (Anexo 1), suplementado com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Alemanha), como descrito anteriormente. Com estes inóculos foram feitos *stocks* de bactérias transformadas, em glicerol a 20% (Anexo 1), que foram armazenados a -80°C. Estes inóculos permitiram também fazer a validação dos clones por sequenciação (Stabvida, Portugal), após extração do ADN plasmídico por Miniprep e digestões enzimáticas, como descritas anteriormente. Os produtos das digestões obtidos foram confirmados por electroforese em minigel de agarose a 1%, nas condições descritas anteriormente. Para facilitar a descrição dos novos plasmídios, os mesmos passaram a denominar-se de pTrcC2, pTrcV3 e pTrcC3.

9. Produção de péptidos recombinantes

Inicialmente foram preparados pré-inóculos de várias colónias de *E. coli* TOP10 transformadas com pTrcC2, pTrcV3 e pTrcC3, em 5 mL de meio LB líquido (Anexo 1), suplementado com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Alemanha). Estes foram colocados a 37°C, 250 rpm, ON.

Foram preparados Erlenmeyers com 500 mL de meio LB líquido (Anexo 1), suplementado com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Alemanha). A cada um foi adicionado o respetivo pré-inóculo preparado anteriormente. Os Erlenmeyers foram colocados a incubar em agitador orbital, a 37°C e 250 rpm. Foram feitas leituras de DO_{600nm} até a mesma atingir o valor de 0,8. A indução da atividade da β-galactosidase das bactérias foi feita por adição de 1mM de IPTG (Anexo 1) (Sigma-Aldrich, Alemanha), com nova incubação em agitador orbital, nas condições anteriores, durante 2h. Os meios de cultura foram colocados a centrifugar (*Beckman J-6M/E Centrifuge*, Beckman Coulter, EUA) durante 15 minutos a 3500 rpm. Após a centrifugação, descartaram-se os sobrenadantes e o homogeneizaram-se os *pellets* com 35 mL de Tampão Guanidina 6M a pH 7.4 (Anexo 1). As células foram a incubar em agitador orbital, a 37° durante 15 minutos. De seguida, procedeu-se à sonicação com 3 ciclos de

10 segundos de ultra-sons (UP200S, Hielscher Ultrasound Technology, Alemanha). Por fim, os lisados celulares foram centrifugados *Centrifuge 5810 R*, Eppendorf, Alemanha) durante 20 minutos, a 3000 rpm, e os sobrenadantes foram recolhidos.

10. Purificação de péptidos recombinantes

Este passo foi realizado com recurso a cromatografia líquida, a *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC), que consiste na separação de proteínas presentes em misturas para sua análise e purificação. Como o vetor plasmídico permitiu a produção de péptidos recombinantes com caudas de poli-histidinas, a purificação foi realizada de acordo com a interação entre as histidinas e o níquel presente na resina de *Sepharose* e por eluição por variação do pH.

O sistema utilizado foi o *GE Pharmacia FPLC system* (GE Healthcare, Inglaterra) e a coluna cromatográfica foi a *HisTrap™ HP*, 5 mL (GE Healthcare, Inglaterra). Para cada péptido a purificar, foi filtrada uma amostra do sobrenadante recolhido anteriormente com um filtro de 0,45 µm. A amostra filtrada foi então diluída na proporção de 1:2 com tampão de ureia 8M pH 7.8 (Anexo 1) e aplicada na coluna. Foi feita uma primeira eluição com o tampão referido anteriormente, seguido de duas eluições com tampão de ureia 8M pH 6 e pH 5.3 (Anexo 1), respetivamente, para eliminação de contaminantes. A eluição do péptido recombinante foi feita com tampão de ureia 8M a pH 4 (Anexo 1). Foram recolhidas várias alíquotas para quantificação do péptido recombinante a Abs = 280, com recurso ao NanoDrop™ (Thermo Scientific, EUA).

11. Avaliação da reatividade dos anticorpos contra os péptidos recombinantes

11.1. Amostras biológicas

Neste estudo foram utilizadas 20 amostras de plasma de indivíduos seropositivos para VIH-2. O seu processamento e pesquisa de anticorpos foram realizados anteriormente, quando utilizados em estudo anterior (Marcelino *et al.*, 2012). Estas amostras foram obtidas em 2003, no Hospital Curry Cabral, em Lisboa, Portugal.

11.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Este procedimento permitiu observar a antigenicidade de cada um dos péptidos purificados. O tipo de ELISA realizado foi pelo método indireto.

Com recurso a um módulo Nunc-Immuno™ com microtiras Maxisorp™ (Thermo Scientific, EUA), adsorveram-se 100 µL/poço de cada péptido recombinante diluído em tampão bicarbonato 0.05M pH 9.4 (Anexo 1). O módulo foi colocado a incubar a 4°C, ON. A figura 12 esquematiza a forma como foi feita a adsorção dos antígenos (péptidos) e também a ordem pela qual se aplicaram os soros.

Antígenos (péptidos)	Soros	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8	SP9	SN	Sem antígeno	
	Poços	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C2	A											SP1	SP2
	B											SP3	SP4
V3	C											SP5	SP6
	D											SP7	SP8
C3	E											SP9	SN
	F											Sem antígeno e sem soro	
C2V3C3	G												
	H												

Figura 12: Representação esquemática da aplicação dos antígenos e dos soros a testar. SP significa soro positivo para VIH-2 e SN soro negativo para VIH-2.

Os péptidos C2, V3 e C3 foram adsorvidos com uma concentração de 25 µg/mL, e o péptido C2V3C3 foi adsorvido com uma concentração de 2,5 µg/mL. Foram feitas duas lavagens com 300 µL/poço com Tampão Tris Salino (do inglês *Tris-Buffered Saline*, TBS) a pH 7.4 (Anexo 1). Os micropoços foram bloqueados com Albumina de Soro Bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 5% (Anexo 1) e incubados 1h, a 37°C. Foram feitas mais duas lavagens com tampão TBS, nas condições anteriores. Em cada micropoço adicionaram-se 100 µL de cada soro diluído em TBS-Tween 20 (Anexo 1) (diluição 1:300) e fez-se nova incubação a 37°C, durante 1h. Após 5 lavagens com TBS-Tween 20, adicionaram-se 100 µL/poço de anticorpo de cabra anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, Alemanha), diluído em TBS-Tween 20 (1:4000), com 0,1% de BSA (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os micropoços foram mais uma vez incubados a 37°C, durante 1h. Depois de lavados 5 vezes nas mesmas condições descritas anteriormente, adicionaram-se 100 µL/poço do substrato cromogénico *p*-nitrofenilfosfato (SIGMAFAST™ *p*-Nitrophenil phosphate Tablets,

Sigma-Aldrich, Alemanha) e incubou-se no escuro durante 30 minutos. De seguida, foram feitas leituras da densidade óptica (DO) em leitor de microplacas (Sinergy™ HT, BioTek®, EUA), a 405 nm.

11.3. Análise estatística

O grau de associação entre a reatividade dos plasmas com os péptidos recombinantes correspondentes às regiões C2, V3 e C3 da gp125 do VIH-2 e a neutralização realizada pelos anticorpos IgG heterólogos presentes nos mesmos plasmas foi determinado com recurso ao GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, Califórnia, EUA). Utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para comparação das médias entre as variáveis e foram calculados coeficientes de correlação de Spearman e de regressão linear para observar a variação entre variáveis. Toda a análise estatística foi realizada com um nível de significância de 5%.

III. Resultados

1. Clonagem

1.1. Caracterização dos *primers* utilizados e dos fragmentos de ADN a amplificar

Os *primers* utilizados na amplificação do ADN das regiões C2, V3 e C3 e do domínio C2V3C3, pertencentes ao gene *env* do VIH-2, foram desenhados e selecionados tendo em conta a sequência nucleotídica para cada região, como descrito no capítulo anterior. As imagens seguintes esquematizam a sequência nucleotídica de cada região e dos seus respetivos *primers*. As sequências nucleotídicas correspondentes aos locais de corte das enzimas de restrição que foram utilizadas para as posteriores digestões enzimáticas encontram-se igualmente assinaladas nas figuras seguintes.

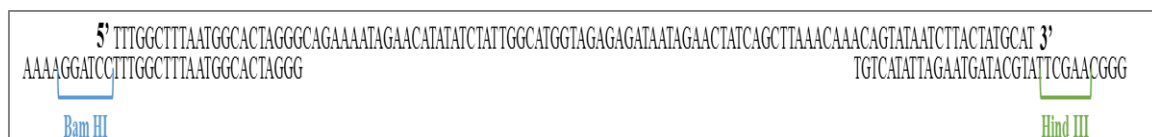


Figura 13: Sequência nucleotídica correspondente à região C2 do gene *env* (5' → 3'). Por baixo e do lado esquerdo, pode ser vista a sequência nucleotídica do *primer* C2F, com a sequência correspondente ao local de corte pela enzima de restrição Bam HI; do lado direito encontra-se a sequência nucleotídica do *primer* C2R, também com a sequência do local de corte pela enzima de restrição Hind III assinalada.

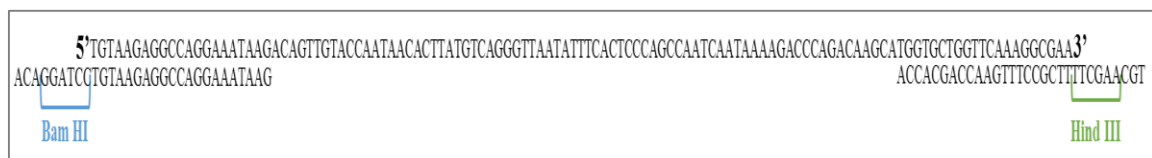


Figura 14: Sequência nucleotídica correspondente à região V3 do gene *env* (5' → 3'). Por baixo e do lado esquerdo, pode ser vista a sequência nucleotídica do *primer* V3F, com a sequência correspondente ao local de corte pela enzima de restrição Bam HI; do lado direito encontra-se a sequência nucleotídica do *primer* V3R, também com a sequência do local de corte pela enzima de restrição Hind III assinalada.

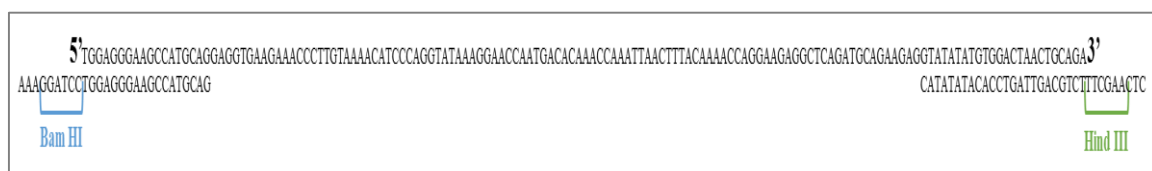


Figura 15: Sequência nucleotídica correspondente à região C3 do gene *env* (5' → 3'). Por baixo e do lado esquerdo, pode ser vista a sequência nucleotídica do *primer* C3F, com a sequência correspondente ao local de corte pela enzima de restrição Bam HI; do lado direito encontra-se a sequência nucleotídica do *primer* C3R, também com a sequência do local de corte pela enzima de restrição Hind III assinalada.

A descrição resumida dos 3 fragmentos de ADN amplificado, em termos de tamanho e do número de aminoácidos ao qual dão origem pode ser encontrada na tabela 4.

Tabela 4: Caracterização das regiões C2, V3 e C3 quanto ao tamanho do fragmento e número de aminoácidos que originam.

Região codificada no gene <i>env</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Número de aminoácidos
C2	108	36
V3	117	39
C3	144	48

1.2. Amplificação das regiões C2, V3 e C3, do gene *env* do VIH-2

Tal como já tinha sido referido no capítulo anterior, inicialmente foi feita uma extração de ADN plasmídico com recurso ao kit comercial *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, Alemanha). Após quantificação com o espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), a concentração de ADN obtido foi de 85 ng/μL. Este foi o ADN que serviu de molde para a amplificação do ADN das regiões C2, V3 e C3, por PCR nas condições descritas no capítulo anterior.

Através da análise dos produtos de PCR por eletroforese em minigel de agarose a 1%, verificou-se a presença de vários fragmentos de ADN amplificado, correspondentes às regiões C2, V3 e C3, como se pode observar na figura 16.

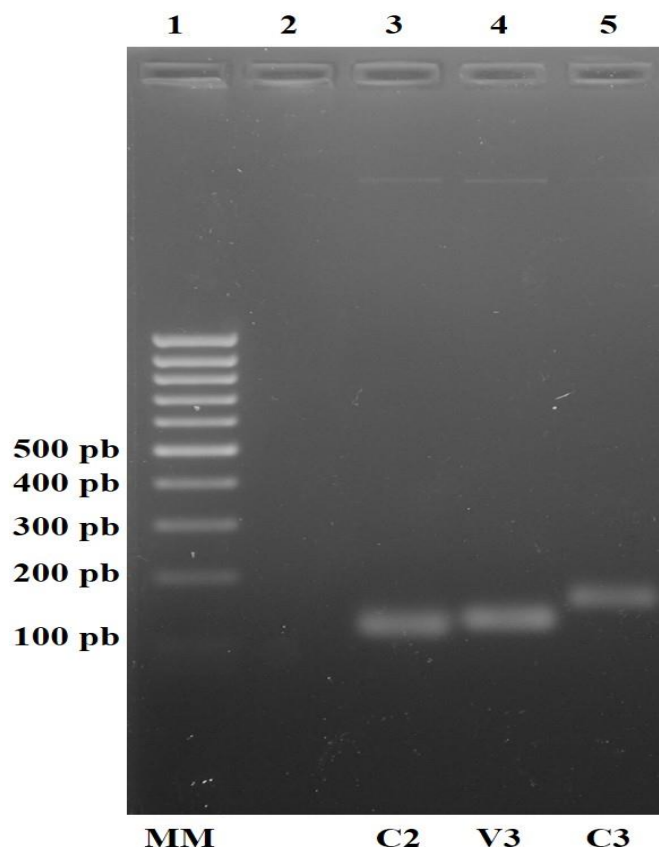


Figura 16: Visualização dos produtos de amplificação do ADN por PCR, após eletroforese em minigel de agarose a 1%, em tampão TAE 1X e brometo de etídeo (1:20000, stock 10%). No poço 1 foi aplicado o Marcador Molecular *Mass Ruler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas, Canadá); no poço 2 não foi aplicado qualquer tipo de amostra; no poço 3, 4 e 5 foram aplicadas misturas de 15 μ L de cada ADN com 5 μ L de *loading dye* 6X (Fermentas, Canadá), correspondentes às regiões C2, V3 e C3, respetivamente.

Na figura 16 podemos ver 3 fragmentos de tamanhos distintos, de acordo com o esperado. Comparando com o marcador molecular, os 3 fragmentos encontram-se entre os 100 e os 200 pb. O fragmento correspondente ao domínio C2 encontra-se perto dos 100 pb, como seria de esperar pois esta região é composta por 108 nucleótidos. Já o fragmento correspondente à região V3, encontra-se quase ao nível do fragmento C2 mas um pouco mais acima, o que também era expectável visto que a região V3 tem 117 nucleótidos. Por fim, o fragmento correspondente à região C3 é a que se dispõe mais acima da marca dos 100 pb e já mais perto da marca dos 200 pb, o que também era esperado, pois esta região é composta por 144 nucleótidos.

Os produtos de PCR foram purificados com utilização de kit comercial e sujeitos a digestão dupla com as enzimas de restrição Bam HI e Hind III (Fermentas, Canadá).

Após a digestão, os fragmentos de ADN obtidos foram purificados por precipitação com etanol absoluto, como descrito no capítulo anterior. Após leituras no espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), as concentrações de ADN obtidas para as regiões C2, V3 e C3 foram de 21,42 ng/μL, 18,80 ng/μL e de 17,11 ng/μL, respectivamente.

1.3. Obtenção do vetor plasmídico

O vetor foi obtido por digestão enzimática do ADN do vetor plasmídico pTrcC2-C3, previamente extraído por Miniprep com recurso a kit comercial. As enzimas de restrição utilizadas foram a Bam HI e a Hind III (Fermentas, Canadá). Depois da digestão enzimática, foi feita uma eletroforese em minigel de agarose a 1% para visualização dos produtos da reação, como pode ser visto na figura 17.

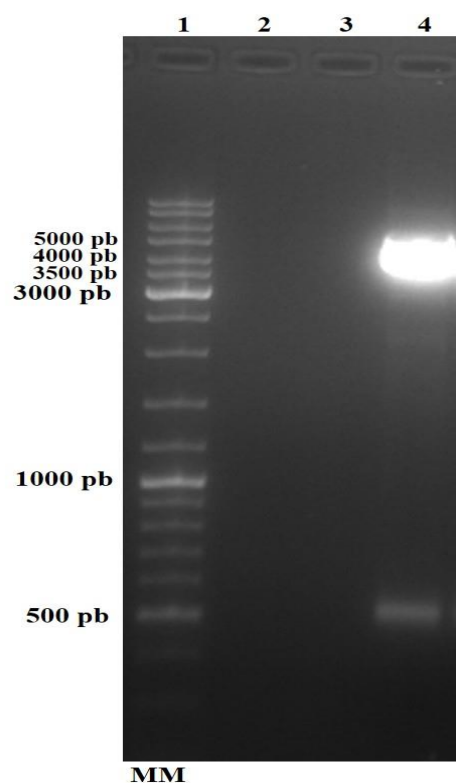


Figura 17: Visualização dos produtos obtidos após separação por eletroforese em minigel de agarose a 0,8%, em tampão TAE 1X e brometo de etídeo (1:20000, stock 10%), correspondentes aos produtos resultantes da digestão dupla com as enzimas de restrição Bam HI e Hind III (Fermentas, Canadá). No poço 1 foi aplicado o Marcador Molecular *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, Canadá); nos poços 2 e 3 não foram aplicadas amostras; no poço 4 foi aplicada uma mistura de reação com 35 μL de ADN digerido e 8 μL de *loading dye* 6X (Fermentas, Canadá).

Tal como se pode observar na figura 17, foram obtidos 2 fragmentos, um de menor peso molecular correspondente à região C2V3C3 e outro fragmento de maior peso molecular, correspondente ao vetor sem o domínio C2V3C3. Foi com recurso à extração do ADN a partir do minigel que foi obtido o vetor plasmídico. Após purificação por utilização do kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Inglaterra), foi feita leitura em espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a concentração do ADN obtida do novo vetor plasmídico foi de 10,8 ng/μL.

Para haver ligação entre o ADN amplificado para cada uma das regiões por PCR e o vetor plasmídico obtido após digestão e purificação, foram feitas misturas de reação, utilizadas posteriormente na transformação de bactérias competentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen™, EUA). Após a seleção dos clones recombinantes, foram preparadas culturas líquidas para extração do ADN plasmídico dos vetores pTrcC2, pTrcV3 e pTrcC3, respetivamente, por Miniprep com recurso a kit comercial. Após digestão dupla com enzimas de restrição foi feita uma eletroforese em minigel de agarose a 1% para confirmação dos produtos de reação obtidos, tal como pode ser visto na figura 18.

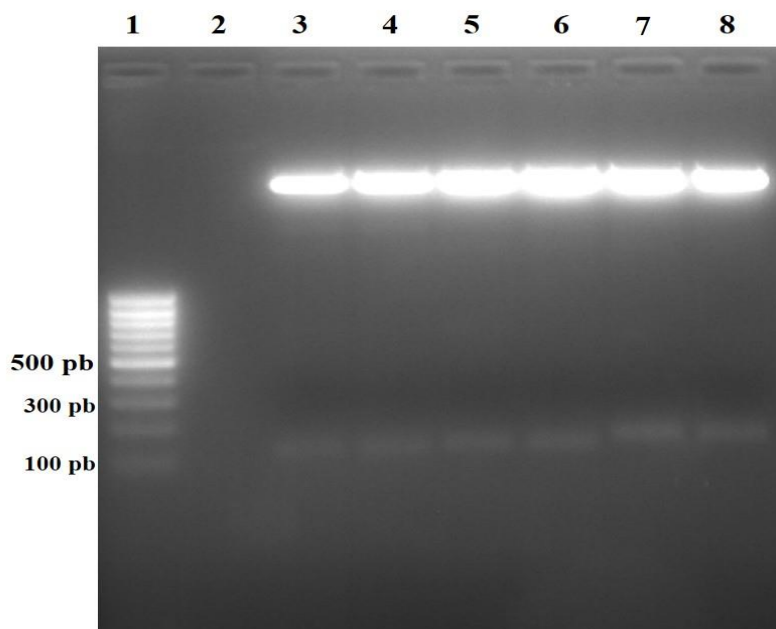


Figura 18: Visualização dos produtos resultantes da digestão dupla do ADN plasmídico dos vetores pTrcC2, pTrcV3 e pTrcC3, respetivamente, após separação por eletroforese em minigel de agarose a 1%. No poço 1 foi aplicado o Marcador Molecular *Mass Ruler™ DNA Ladder, Low Range* (Fermentas, Canadá). Nos poços 3 e 4 encontram-se os produtos da digestão do ADN do vetor pTrcC2, nos poços 5 e 6 os produtos da digestão do ADN do vetor do pTrcV3 e, por fim, nos poços 7 e 8 podem ser vistos os produtos de digestão do ADN do vetor pTrcC3.

Como se pode observar na figura 18, os fragmentos com maior intensidade presentes nos poços numerados de 3 a 8 correspondem aos vetores sem os respetivos fragmentos C2, V3 e C3. Nos poços 3 e 4 encontram-se fragmentos de ADN com menor intensidade, perto do fragmento correspondente aos 100 pb, que são relativos à região C2. Também nos poços 5 e 6 podem ser observados dois fragmentos de menor intensidade correspondentes à região V3. Por último, nos poços 7 e 8 podem ser visualizados também dois fragmentos de menor intensidade, sendo os mesmos correspondentes ao ADN da região C3.

Os produtos da digestão dupla enzimática foram também enviados para sequenciação (Stabvida, Portugal) e os resultados obtidos permitiram validar os clones produzidos.

2. Purificação dos péptidos recombinantes

A partir de pré-inóculos com colónias de *E. coli* TOP10 transformadas com pTrcC2, pTrcV3 e pTrcC3 (plasmídios clonados com ADN das regiões C2, V3 e C3, respetivamente), foram produzidos os péptidos recombinantes através da incubação dos pré-inóculos em meio LB líquido (Anexo 1), suplementado com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Alemanha) e indução das culturas com 1mM de IPTG (Anexo 1) (Sigma-Aldrich, Alemanha). Após extração dos sobrenadantes, estes foram purificados por FPLC, com recurso ao *GE Pharmacia FPLC system* (GE Healthcare, Inglaterra) e utilização da coluna cromatográfica foi a *HisTrap™ HP*, 5 mL (GE Healthcare, Inglaterra). A purificação foi feita por eluições sucessivas com diferentes valores de pH do tampão de ureia 8M (Anexo 1). As trocas do tampão com pH diferente foram feitas com base na análise do cromatograma.

A figura 19 representa um perfil cromatográfico obtido durante o processo de purificação dos vários péptidos recombinantes.

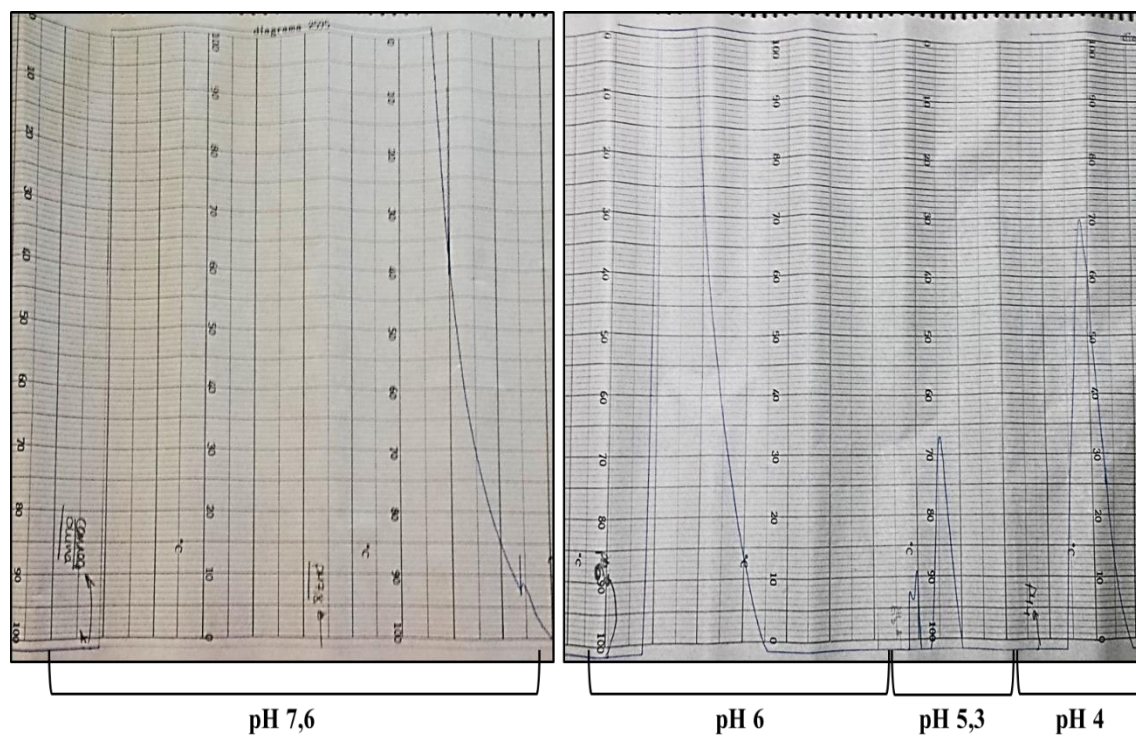


Figura 19: Exemplo de um cromatograma obtido durante o processo de purificação de um péptido recombinante.

Durante a aplicação do tampão de ureia a pH 4 foram recolhidas simultaneamente alíquotas para quantificação de proteína a $Abs = 280$, com recurso ao NanoDrop™ (Thermo Scientific, EUA). Os valores obtidos para a concentração de péptidos recombinantes purificados podem ser vistos na tabela 5.

Tabela 5: Concentração de péptido recombinante ($\mu\text{g/mL}$) obtido nas alíquotas numeradas de 1 a 15, após quantificação no espectrofotómetro NanoDrop™, com Abs = 280.

Alíquotas	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
	prC2	prV3	prC3
1	10	10	20
2	12	30	30
3	13	50	70
4	30	136,7	86,7
5	36,7	173	96,7
6	86,7	190	120
7	96,7	210	206,7
8	130	177,5	346,7
9	116,7	167,5	313
10	83	165	270
11	70	150	180
12	70	130	150
13	50	110	139
14	40	90	110
15	20	60	90

A recolha das alíquotas teve início logo após a aplicação do tampão de ureia a pH 4, pelo que a alíquota 1 corresponde ao início da eluição. Através da análise do cromatograma em conjunto com os valores da concentração de péptido eluído concluiu-se que a prC2 estava presente nas alíquotas identificadas de 6 a 10. A mesma análise permitiu concluir que a prV3 estava presente nas alíquotas numeradas de 5 a 8 e que a prC3 se encontrava nas alíquotas numeradas de 7 a 10.

3. Avaliação da reatividade entre anticorpos e péptidos recombinantes

Para analisar a reatividade entre anticorpos anti-VIH-2 e os péptidos recombinantes produzidos foram realizadas várias ELISAs por método indireto. Os antígenos adsorvidos no módulo Nunc-Immuno™ com microtiras Maxisorp™ (Thermo Scientific, EUA) foram os péptidos recombinantes produzidos. Nestes ensaios foram utilizadas 20 amostras de plasma de indivíduos seropositivos para VIH-2, assim como 10 amostras de plasma de indivíduos seronegativos para VIH-2. As densidades óticas foram obtidas com recurso a leitor de microplacas (Sinergy™ HT, BioTek®, EUA), a 405 nm.

O *cutoff* clínico foi calculado com base em amostras de plasma de indivíduos negativos para a infecção por VIH, através da soma entre a média dos valores da DO obtida para 10 plasmas negativos mais dois terços da média obtida. A reatividade dos soros provenientes de indivíduos seropositivos para VIH-2 foi calculada através da divisão do valor da DO obtida de cada soro testado contra o péptido recombinante e o valor do *cutoff*. A tabela 6 resume a análise da reatividade de todos os soros, contra cada uma das proteínas recombinantes.

Tabela 6: Serorreatividade de cada soro testado contra todos os péptidos recombinantes produzidos. Para valores superiores a 1, o soro é considerado serorreativo.

Amostras	DO/Cutoff			
	C2	V3	C3	C2V3C3
HCC 1.03	2,033	1,281	1,661	5,352
HCC 2.03	0,915	0,942	0,687	6,310
HCC 3.03	0,810	1,366	1,157	3,230
HCC 4.03	0,639	0,457	0,482	2,559
HCC 5.03	0,729	0,864	1,263	3,883
HCC 6.03	0,913	1,678	0,873	3,659
HCC 7.03	0,603	0,664	0,449	4,488
HCC 8.03	0,723	0,885	0,786	3,816
HCC 9.03	1,309	3,532	2,705	2,500
HCC 10.03	0,928	1,761	1,148	2,720
HCC 11.03	1,645	3,427	1,964	5,254
HCC 12.03	0,880	1,942	0,901	4,782
HCC 13.03	0,810	1,727	1,105	1,904
HCC 14.03	1,078	3,499	1,854	3,272
HCC 15.03	1,625	4,618	2,833	1,547
HCC 16.03	1,072	0,789	0,990	8,198
HCC 17.03	0,821	1,302	1,552	8,539
HCC 18.03	0,922	2,123	3,011	6,751
HCC 19.03	1,233	3,635	3,909	11,348
HCC 20.03	0,592	1,099	1,113	10,219

Portanto, dos 20 soros testados 7 reagem com a prC2, 14 reagem contra a prV3, 13 reagem contra a prC3 e todos os soros reagem contra a prC2V3C3. A figura 20 permite perceber melhor a distribuição dos valores das serorreatividades contra cada uma das regiões.

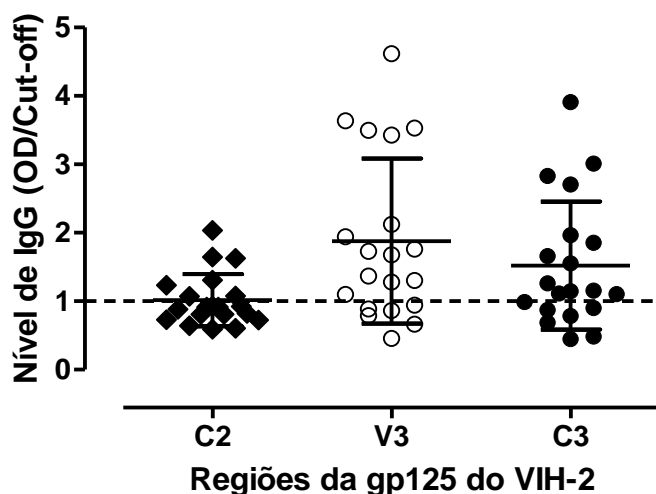


Figura 20: Reatividade dos anticorpos IgG contra a região C2, V3 e C3, respetivamente. A tracejado indica o limite da determinação da serorreatividade, sendo que acima de 1 o soro é considerado serorreativo.

3.1. Correlação entre serorreatividade e neutralização dos anticorpos

Os 20 plasmas utilizados neste estudo foram analisados anteriormente quanto à presença de anticorpos IgG neutralizantes e a potência da sua resposta (mediana da IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)) em um estudo anterior (Marcelino *et al.*, 2012). Nesse estudo foi observado que todas as amostras obtidas em 2003 provenientes dos doentes HCC 1 – HCC 20 continham anticorpos IgG neutralizantes heterólogos. Através de ensaios de neutralização foi possível elaborar uma curva que permitiu extrair os valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para cada um dos soros. São estes valores que indicam a potência da resposta neutralizante e podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7: Potência da resposta neutralizante por anticorpos IgG, presentes em amostras de doentes infectados por VIH-2.

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL)
HCC 1.03	4,50
HCC 2.03	8,73
HCC 3.03	13,07
HCC 4.03	12,31
HCC 5.03	8,21
HCC 6.03	0,40
HCC 7.03	0,71
HCC 8.03	11,79
HCC 9.03	13,19
HCC 10.03	6,61
HCC 11.03	23,42
HCC 12.03	2,85
HCC 13.03	6,63
HCC 14.03	6,49
HCC 15.03	4,38
HCC 16.03	7,99
HCC 17.03	7,52
HCC 18.03	6,75
HCC 19.03	6,37
HCC 20.03	17,23

Com os valores de IC₅₀ (µg/mL) obtidos para cada um dos soros e relacionando com os valores da serorreatividade obtidos entre cada soro e respetivo péptido recombinante, foi possível obter valores para verificar se há correlação entre as serorreatividade e a neutralização heteróloga. As análises estatísticas foram realizadas recorrendo ao programa GraphPad Prism version 5.01. O tipo de correlação utilizada foi a de Spearman, sendo que nos gráficos construídos foram feitas retas de regressão linear para se perceber se as variáveis estavam relacionadas. Os testes foram feitos com um nível de significância de 5%, o que significa que para os valores serem significativos, $P < 0,005$.

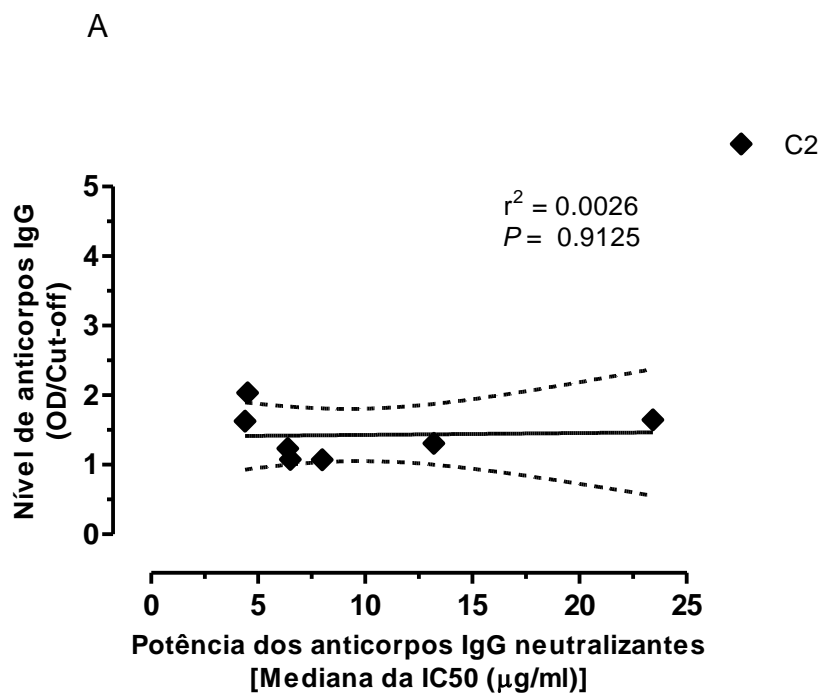


Figura 21: Relação entre a potência dos anticorpos neutralizantes heterólogos e a reatividade dos anticorpos que reagiram contra o péptido recombinante C2. A potência é medida com os valores das medianas da IC₅₀. Na figura está também presente uma reta de regressão linear.

O valor obtido para o coeficiente da correlação de Spearman foi $r = -0,1786$ com $P = 0,7131$, o que significa que não existe associação entre a neutralização por IgG heterólogos e a serorreatividade contra a região C2.

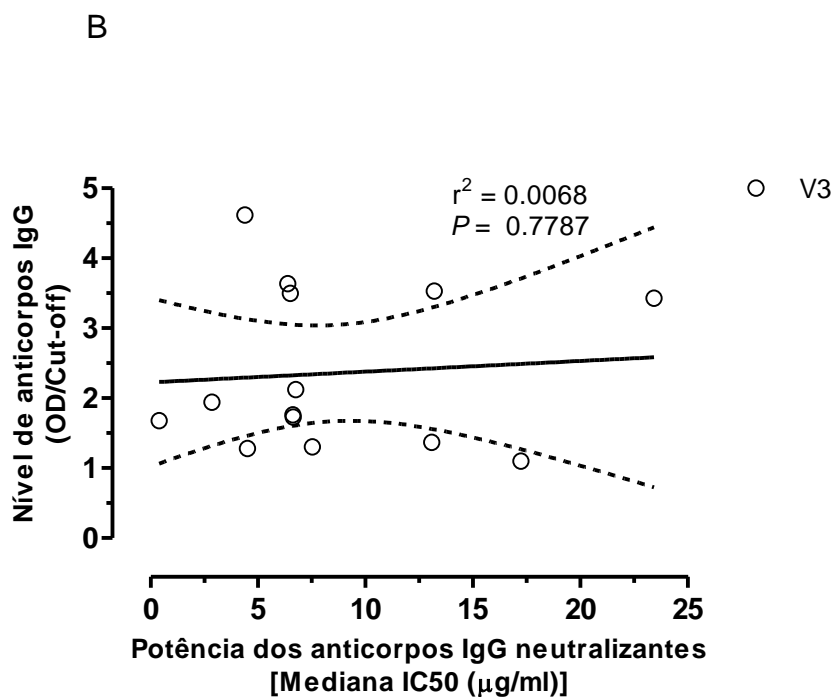


Figura 22: Relação entre a potência dos anticorpos neutralizantes heterólogos e a reatividade dos anticorpos que reagiram contra o péptido recombinante V3. A potência é medida com os valores das medianas da IC₅₀. Na figura está também presente uma reta de regressão linear.

No caso da região V3, os valores obtidos para o coeficiente de correlação de Spearman foram $r = -0,1604$ e $P = 0,5838$. Mais uma vez, visto que $P > 0,005$, então não existe associação entre a serorreatividade contra a região V3 e a neutralização por parte dos anticorpos IgG heterólogos.

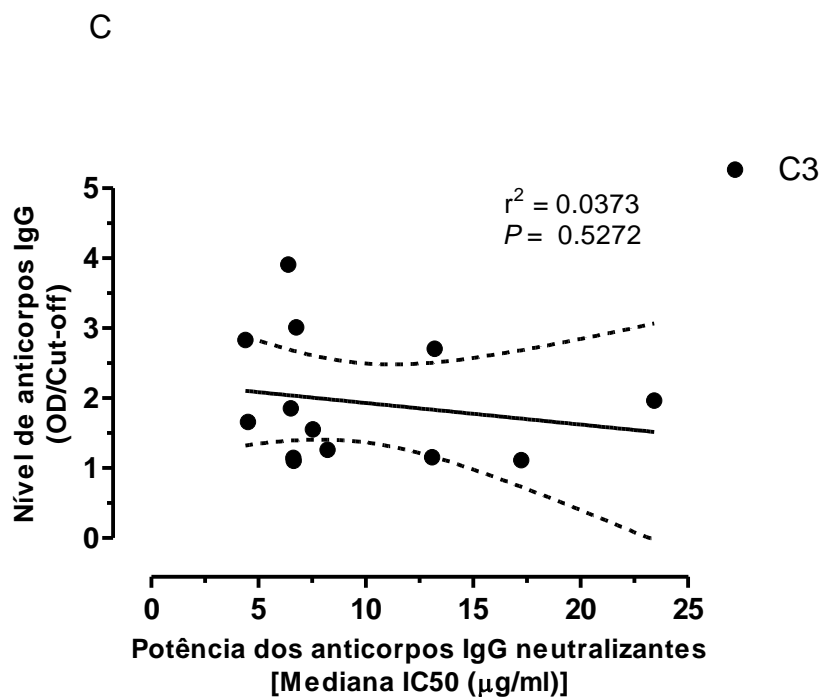


Figura 23: Relação entre a potência dos anticorpos neutralizantes heterólogos e a reatividade dos anticorpos que reagiram contra o péptido recombinante C3. A potência é medida com os valores das medianas da IC₅₀. Na figura está também presente uma reta de regressão linear.

Relativamente à região C3, os valores obtidos para a correlação de Spearman foram: $r = -0,2857$ e $P = 0,3430$. Também não possível associar a neutralização dos anticorpos neutralizantes e a serorreatividade contra o péptido recombinante referente à região C3.

IV. Discussão e conclusões

O Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é uma doença do sistema imunitário caracterizada por uma série de condições que permitem o surgimento de infeções oportunistas que podem levar à morte. O agente etiológico responsável pela SIDA é o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e existem dois tipos: o VIH-1 e o VIH-2 (Sharp *et al.*, 2011). Quando comparados, o VIH-2 tem uma taxa de transmissão menor e uma progressão da doença mais lenta, o que faz com que os indivíduos infetados tenham um melhor prognóstico e consigam viver mais anos sem SIDA.

Estruturalmente, ambos os vírus são constituídos por um invólucro que permite a entrada do vírus na célula hospedeira através da interação entre as glicoproteínas que o constituem e os recetores e os co-recetores da célula hospedeira. O invólucro do VIH-1 e do VIH-2 é constituído por glicoproteínas transmembranares e glicoproteínas de superfície. Estas últimas são constituídas por regiões constantes e por regiões hipervariáveis.

Após a infeção por VIH, o sistema imunitário do indivíduo infetado vai desenvolver uma série de respostas que podem atuar nas diferentes etapas da infeção. Um exemplo é a produção de anticorpos neutralizantes (nAbs) que se ligam a glicoproteínas do involucro, como forma de impedir a entrada do vírus na células. As diferenças entre o VIH-1 e o VIH-2 influenciam na resposta dada por esta linha de defesa do sistema imunitário. O controlo do VIH-1 pelos nAbs é menos eficiente devido ao facto de este vírus conseguir escapar melhor durante a fase aguda da infeção. O VIH-2 aparenta ser mais suscetível à resposta humoral realizada pelos nAbs, sejam os mesmos autólogos ou heterólogos (Björling *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 2005; Barroso *et al.*, 2011).

A suscetibilidade dos vírus à neutralização é influenciada pelo domínio C2V3C3 da glicoproteína de superfície do VIH. Esta região tem influência na atividade imunitária que ocorre na fase crónica de infeção e que no caso de infeção por VIH-2 ocorre de uma forma mais atenuada, o que pode dever-se ao facto da região C2V3C3 deste vírus ter uma atividade imunossupressiva. Já o domínio C2V3C3 do VIH-1 não tem a mesma atividade imunossupressiva, o que pode explicar a elevada ativação imunitária, que leva a uma falência do sistema imunitário e, consequentemente, ao surgimento de SIDA (Cavaleiro *et al.*, 2000; Barroso *et al.*, 2011). Estudos anteriores demonstraram que a região C2V3C3

é um alvo preferencial dos nAbs (Marcelino *et al.*, 2010; Marcelino *et al.*, 2012). A região V3 é responsável pela indução e produção de nAbs (Borrego *et al.*, 2008). Embora se saiba que a região V3 contém epitopos neutralizantes, ainda não se sabe qual o papel das regiões C2 e C3 na indução de anticorpos neutralizantes.

Com o objetivo principal de avaliar a resposta humoral neutralizante contra as regiões C2, V3 e C3, respetivamente, foram produzidos vetores plasmídicos clonados com fragmentos de ADN correspondentes a cada uma das regiões. Após transformação de bactérias competentes com os respetivos vetores, foram produzidos os péptidos recombinantes prC2, prV3 e prC3. O péptido recombinante correspondente à região C2V3C3 também foi produzida com auxílio de bactérias transformadas em estudos anteriores. Depois de purificados, todos os péptidos foram utilizados em imunoensaios. Várias microplacas de ELISA foram revestidas com todos os péptidos a serem avaliados, sendo que após a aplicação de amostras de doentes seropositivos para VIH-2 e posterior adição de substrato, foi possível avaliar a reatividade de cada uma das regiões estudadas, através da leitura no espectrofotómetro da reação colorimétrica.

Das 20 amostras seropositivas para VIH-2 utilizadas, todos os soros apresentaram reatividade contra o péptido correspondente à região C2V3C3, ou seja, 100% dos soros têm anticorpos que reagem na presença de C2V3C3. Este resultado vem corroborar resultados de estudos anteriores que dizem que esta região é imunodominante e um dos principais alvos da neutralização por anticorpos (Borrego *et al.*, 2008, Marcelino *et al.*, 2012).

Dos novos péptidos recombinantes produzidos, a prV3 foi a que demonstrou produzir maior reatividade em contacto com anticorpos anti-VIH-2, com 70% dos soros a reagirem positivamente na sua presença. De acordo com alguns estudos anteriores, esta região é considerada como um dos principais determinantes da neutralização, tal como acontece com a mesma região do VIH-1 (Björling *et al.*, 1994; Uchtenhagen *et al.*, 2011). No entanto, a região V3 do VIH-2 é mais acessível e menos variável quando comparada com a mesma região do VIH-1. A sua pouca variabilidade pode explicar porque é que grande maioria dos soros (14 dos 20 testados) reagiu com o péptido recombinante correspondente à região V3.

Relativamente à prC3, 65% dos soros testados reagiram positivamente contra este péptido recombinante. Um estudo realizado anteriormente permitiu perceber que esta região possa ser, tal como a região V3, um dos principais domínios neutralizáveis (Barroso *et al.*, (2011). Isto pode ser estar relacionado com o facto da região C3 estar mais exposta, fazendo com que seja mais acessível e possa conter epitopos neutralizáveis por anticorpos, tal como acontece com a mesma região do VIH-1 (Moore *et al.*, 2008).

Por fim, a prC2 foi o péptido recombinante com um menor número de soros a reagir contra si. Apenas 35% dos soros apresentaram reatividade na presença da prC2. Estudos anteriores demonstraram que a região C2 do VIH-2 contém aminoácidos que estão sob seleção positiva contínua, de forma a haver uma evolução nesta região (Borrego *et al.*, 2008). Isto pode significar que os anticorpos produzidos presentes nos soros testados não sejam específicos para a prC2 produzida e, por isso, haver pouca reatividade.

Analisando as reatividades obtidas contra todos os péptidos recombinantes utilizados, alguns soros reagiram contra a prC2V3C3 mas não reagiram contra nenhum dos outros péptidos recombinantes utilizados. A existência de anticorpos anti-VIH-2 presentes nos soros que tenham especificidade em epitopos presentes no local de ligação entre duas regiões diferentes, quer seja C2V3 ou V3C3, pode ser uma explicação para o facto de não haver reatividade contra os péptidos. Se os anticorpos se ligarem a epitopos que tenham aminoácidos das duas regiões, ou seja, aminoácidos que constituam a fronteira entre uma região e a outra, os mesmos não se ligam aos péptidos de cada região por não reconhecerem nenhum epitopo mas podem ligar-se à prC2V3C3.

Quanto à capacidade de neutralização de cada uma das regiões por parte dos anticorpos presentes nos soros, apenas foi possível a elaboração de correlações a partir de dados obtidos anteriormente (Marcelino *et al.*, 2012) e dos dados sobre as serorreatividades obtidos neste estudo. Não se verificaram associações entre cada uma das regiões, C2, V3 e C3, respetivamente, e a neutralização feita por anticorpos heterólogos. Isto pode ser indicativo que estas regiões quando separadas podem não conter determinantes da neutralização. No entanto, foi demonstrado que existe uma associação entre a neutralização por parte de anticorpos IgG heterólogos e a ligação dos anticorpos ao domínio C2V3C3, o que permite afirmar que os anticorpos produzidos são

específicos para essa região (Marcelino *et al.*, 2012). De facto, todos os soros testados neste estudo reagiram contra o péptido recombinante C2V3C3.

Estudos anteriores demonstraram que a estrutura em *loop* da região V3 de vírus susceptíveis e de vírus resistentes à neutralização é apresentada de maneira diferente (Marcelino *et al.*, 2012) e que as mudanças na conformação devem-se a interações não-covalentes entre esta região e as regiões adjacentes C2 e C3 (Barroso *et al.*, 2011). Os resultados obtidos neste estudo não demonstram que a neutralização possa ser dirigida a nenhuma das regiões C2, V3 e C3 separadamente. No entanto, estes resultados, juntamente com os resultados obtidos nos estudos referidos anteriormente podem ser indicativos que estas regiões possam ser associadas à neutralização heteróloga quando em conjunto no domínio C2V3C3. Isto pode dever-se ao facto de algum dos epitopos alvo se formar com aminoácidos de duas regiões adjacentes ou se os anticorpos neutralizantes tiverem como alvo epitopos conformacionais que só se formam quando as três regiões se apresentam ligadas.

Perspetivas futuras

O objetivo principal do trabalho desenvolvido para a elaboração desta dissertação foi avaliar as regiões C2, V3 e C3, do domínio C2V3C3 do gene *env* do VIH-2 quanto ao potencial de neutralização por anticorpos. Os métodos utilizados permitiram a produção de péptidos recombinantes purificados referentes a cada uma das regiões mas como não foi possível a execução de ensaios de neutralização, a relação entre a neutralização por ligação dos anticorpos aos péptidos recombinantes teve de ser avaliada por associação com valores obtidos anteriormente. Embora este estudo sugira que as regiões C2, V3 e C3 não são susceptíveis à indução de respostas neutralizantes quando separadas, o mesmo pode não ser suficiente para concluir que estas regiões quando analisadas separadamente não têm influência na neutralização. Por isso, futuramente, deverão ser feitos ensaios de neutralização que permitam perceber diretamente se as regiões C2, V3 e C3, respetivamente, são susceptíveis à neutralização por anticorpos, sejam os mesmos autólogos ou heterólogos.

Outro estudo que poderia ser feito seria a interferência das modificações pós-traducionais na reatividade entre os péptidos recombinantes e os anticorpos anti-VIH-2 presentes nos soros testados. Dado que neste estudo os péptidos recombinantes foram produzidos em *E. coli* TOP10, ou seja, em um sistema procariota, os mesmos não sofreram as modificações que acontecem após a tradução das proteínas, como por exemplo, a glicosilação. Estudos anteriores permitiram observar que o padrão de glicosilação, assim como a adição de glicanos, no domínio C2V3C3 do gene *env* do VIH-2 conferem proteção ao vírus no sentido em que influencia a neutralização por anticorpos e permite a evasão do vírus ao sistema imunitário do indivíduo infetado. Uma forma de analisar a influência das modificações pós-traducionais seria fazer a produção de péptidos recombinantes em um sistema eucariota, como por exemplo, em leveduras ou baculovírus.

V. Referências Bibliográficas

- Alfano M, Poli G. 2005. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Molecular Immunity* 42: 161-82.
- Azevedo-Pereira J, Santos-Costa Q, Mansinho K, Moniz-Pereira J. 2003. Identification and characterization of HIV-2 strains obtained from asymptomatic patients that do not use CCR5 or CXCR4 coreceptors. *Virology* 13: 136-46.
- Azevedo-Pereira J, Santos-Costa Q, Moniz-Pereira J. 2005. HIV-2 infection and chemokine receptors usage – clues to reduced virulence of HIV-2. *Current HIV Research* 3: 3-16.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Barroso H, Borrego P, Bártolo I, Marcelino JM, Família C, Quintas A, Taveira N. 2011. Evolutionary and structural features of the C2, V3 and C3 envelope regions underlying the differences in HIV-1 and HIV-2 biology and infection. *PLoS One* 6: e14548.
- Benjamin J, Ganser-Pornillos BK, Tivol WF, Sundquist WI, Jensen GJ. 2004. Three-dimensional structure of HIV-1 virus-like particles by electron cryotomography. *Journal of Molecular Biology* 346: 577-588.
- Berry N, Ariyoshi K, Jaffar S, Sabally S, Corrah T, Tedder R, Whittle H. 1998. Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *Journal of Human Virology* 1: 457-68.
- Björling E, Chiodi F, Utter G, Norrby E. 1994. Two neutralizing domains in the V3 region in the envelope glycoprotein gp125 of HIV type 2. *Journal of Immunology* 152: 1952-1959.

- Björling E, Scarlatti G, von Gegerfelt A, Albert J, Biberfeld G, Chiodi F, Norrby E, Fenyö EM. 1993. Autologous neutralizing antibodies prevail in HIV-2 but not in HIV-1 infection. *Virology* 193: 528-530
- Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R, Garcia E, Dinkins C, Leuba F, Wu L, Schwartz O, Deretic V, Piguet V. 2010. Human Immunodeficiency Virus-1 inhibition of immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses. *Immunity* 32, 654-669.
- Borrego P, Marcelino JM, Rocha C, Doroana M, Antunes F, Maltez F, Gomes P, Novo C, Barroso H, Taveira N. 2008. The role of the humoral immune response in the molecular evolution of the envelope C2, V3 and C3 regions in chronically HIV-2 infected patients. *Retrovirology* 5: 78.
- Borrego P, Taveira N. 2013. HIV-2 susceptibility to entry inhibitors. *AIDS* 15: 49-61.
- Bour S, Geleziunas R, Wainberg. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiological Reviews*. 59: 63-93.
- Brun-Vézinet F, Charpentier C. 2013. Update on the human immunodeficiency virus. *Médecine et Maladies Infectieuses* 43: 177-84.
- Bunnik EM, Lobbrecht MSD, van Nuenen AC, Schuitemaker H. 2010. Escape from autologous humoral immunity of HIV-1 is not associated with a decrease in replicative capacity. *Virology* 397: 224-230.
- Bunnik EM, Quakkelaar ED, van Nuenen AC, Boeser-Nunnink B, Schuitemaker H. 2007. Increased neutralization sensitivity of recently emerged CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 strains compared to coexisting CCR5-using variants from the same patient. *Journal of Virology* 81: 525-531.
- Buonaguro L, Tornesello M, Buonaguro F. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenic and therapeutic implications. *Journal of Virology* 81: 10209-19.

- Cavaleiro R, Sousa AE, Loureiro A, Victorino RM. 2000. Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *AIDS* 14: 2679-2686.
- Cavaleiro R, Tendeiro R, Foxall RB, Soares RS, Baptista AP, Gomes P, Valadas E, Victorino RMM, Sousa AE. 2013. Monocyte and myeloid dendritic cell activation occurs throughout HIV type 2 infection, na attenuated for of HIV disease. *Journal of Infection Diseases* 207: 1730-1742.
- CDC. 1981. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homossexual men New York City and California . *MMWR. Morbidity Mortality Weekly Report* 30: 305-308.
- CDC. 1983. Prevention of acquired immune deficiency syndrome (AIDS): report of inter-agency recommendations. *MMWR. Morbidity Mortality Weekly Report* 32: 101-103.
- Chauveau L, Puigdomenech I, Ayinde D, Roesch F, Porrot Françoise, Bruni D, Visseaux B, Descamps D Schwartz O. 2015. HIV-2 infects resting CD4+ T cells but not monocyte-derived dendritic cells. *Retrovirology* 12: 2.
- Checkley MA, Luttge BG, Freed EO. 2011. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking and incorporation. *Journal of Molecular Biology*. 410: 582-608.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L. 1986. Isolation of a new human retrovírus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346.
- Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BE. 2011. Acute HIV-1 Infection: Basic, clinical and public health perspectives. *The New England Journal of Medicine* 364: 1943-1954.
- Conley AJ, Gorny MK, Kessler JA II, Boots LJ, Ossorio-Castro M, Koenig S, Lineberger DW, Emini EA, Williams C, Zolla-Pazner S. 1994. Neutralization of primary human immunodeficiency virus type I isolates by the broadly reactive anti-V3 monoclonal antibody, 447-52D. *Journal of Virology* 68: 6994-7000.

- Derdeyen CA, Silvestri G. 2005. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Current Opinion in Immunology* 17: 366-373.
- Duvall MG, Jaye A, Dong T, Brenchley JM, Alabi AS, Jeffries DJ, van der Sande M, Togun TO, McConkey SJ, Douek DC, McMichael AJ, Whittle HC, Koup RA, Rowland-Jones SL. 2006. Maintenance of HIV-specific CD4+ T cell help distinguishes HIV-2 from HIV-1 infection. *Journal of Immunology* 176: 6973-6981.
- Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, Whittle HC, Roederer M, Rowland-Jones SL, Koup RA. 2008. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *European Journal of Immunology* 38: 350-363
- Esbjörnsson J, Månsson F, Kvist A, Isberg PE, Nowroozalizadeh S, Biague AJ, da Silva ZJ, Jansson M, Fenyö EM, Norrgren H, Medstrand P. 2012. Inhibition of HIV-1 disease progression by contemporaneous HIV-2 infection. *The New England Journal of Medicine* 367: 224-232
- Essex M, McLane MF, Lee TH, Tachibana N, Mullins JI, Kreiss J, Kasper CK, Poon MC, Landay A, Stein SF, Francis DP, Cabradilla C, Lawrence DN, Evatt BL. 1983. Antibodies to human T-cell leukemia virus membrane antigens (HTLV-MA) in hemophiliacs. *Science* 221: 1061-4.
- Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. 2010. HIV virology and pathogenic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 46: 5-14.
- Ford ES, Puroh CE, Sereti I. 2009. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV infection: the calm before the storm. *Current Opinion in HIV and AIDS* 4: 206-214.
- Freed EO. 2001. HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 26: 13-33.
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield, R, Oleske J, Safai B, White B, Foster P, Markham PD. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-3.

- Gautier D, Beq S, Cortesao CS, Sousa AE, Cheynier R. 2007. Efficient thymopoiesis contributes to the maintenance of peripheral CD4 T cells during chronic human immunodeficiency virus type 2 infection. *Journal of Virology* 81: 12685-12688.
- Gorny MK, Revesz K, Williams C, Volsky B, Louder MK, Anyangwe CA, Krachmarov C, Kayman SC, Pinter A, Nadas A, Nyambi PN, Mascola JR, Zolla-Pazner S. 2004. The V3 loop is accesible on the Surface of most human immunodeficiency virus type 1 primary isolates and serves as a neutralization epitope. *Journal of Virology* 78: 2394-2404.
- Harris C, Small CB, Klein RS, Friedland GH, Moll B, Emeson EE, Spigland I, Steigbigel NH. 1983. Immunodeficiency in female sexual partners of men with the acquired immunodeficiency síndrome. *The New England Journal of Medicine* 308: 1181-4.
- Hoffman TL, Doms RW. 1999. HIV-1 envelope determinants for cell tropism and chemokine receptor use. *Molecular Membrane Biology* 16: 57-65.
- Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD. 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310: 1025-1028.
- Huang J, Kang BH, Pancera M, Lee JH, Tong T, Feng Y, Georgiev IS, Chuang G, Druz A, Doria-Rose N, Laub L, Sliepen K, van Gils MJ, de la Peña AT, Derking R, Klasse PJ, Migueles SA, Bailer RT, Alam M, Pugach P, Haynes BF, Wyatt RT, Sanders RW, Binley JM, Ward AB, Mascola JR, Kwong PD, Connors M. 2014. Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-120 interface. *Nature* 515: 138-142.
- Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. 2010. HIV-2 CRF01_AB: first circulating form of HIV-2. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 54: 241-247.

- Kong R, Li H, Bibollet-Ruche F, Decker JM, Zheng NN, Gottlieb GS, Kiviat NB, Sow PS, Georgiev I, Hahn BH, Kwong PD, Robinson JE, Shaw GM. 2012. Broad and potent neutralizing antibody responses elicited in natural HIV-2 infection. *Journal of Virology* 86: 947-960.
- Kong R, Li H, Georgiev I, Changela A, Bibollet-Ruche F, Decker JM, Rowland-Jones SL, Jaye A, Guan Y, Lewis GK, Langedijk JPM, Hahn BH, Kwong PD, Robinson JE, Shaw GM. 2012. Epitope Mapping of Broadly Neutralizing HIV-2 Human Monoclonal Antibodies. *Journal of Virology* 86: 12115-12128.
- Koressaar T, Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289-91.
- Krachmarov CP, Honnen WJ, Kayman SC, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Pinter A. 2006. Factors determining the breadth and potency of neutralization by V3-specific human monoclonal antibodies derived from subjects infected with clade A and clade B strains of human immunodeficiency virus type I. *Journal of Virology* 80: 7127-35.
- Lazzarin A, Galli M, Introna M, Negri C, Mantovani A, Mella L, Ferrante P, Parravicini C, Trombini M, Aiuti F, Moroni M, Zanussi C. 1984. Outbreak of persistente, unexplained, generalized lymphadenopathy with immunological abnormalities in drug addicts in Milan. *Infection*. 12: 372-376.
- Lehner T, Wang Y, Pido-Lopez J, Whittall T, Bergmeier LA, Babaahmady K. 2008. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine* 26: 2997-3001.
- Leligdowicz A, Yindom LM, Onyango C, Sarge-Njie R, Alabi A, Cotten M, Vincent T, da Costa C, Aaby P, Jaye A, Dong T, McMichael A, Whittle H, Rowland-Jones S. 2007. Robust Gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 3067-3074.
- Los Alamos HIV database. (<http://www.hiv.lanl.gov/>), acesso em Junho 2015.

- Marcelino JM, Barroso H, Gonçalves F, Silva SM, Novo C, Gomes P, Camacho R, Taveira N. 2006. Use of a new dual-antigen enzyme-linked immunosorbent assay to detect and characterize the human antibody response to the human immunodeficiency virus type 2 envelope gp125 and gp36 glycoproteins. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 607-611.
- Marcelino J, Borrego P, Nilsson C, Família C, Barroso H, Maltez F, Doroana M, Antunes F, Quintas A, Taveira N. 2012. Resistance to antibody neutralization in HIV-2 infection occurs in late stage disease and is associated with X4 tropism. *AIDS* 26: 2275-84.
- Marcelino JM, Borrego P, Rocha C, Barroso H, Quintas A, Novo C, Taveira N. 2010. Potent and Broadly Reactive HIV-2 Neutralizing Antibodies Elicited by a Vaccinia Virus Vector Prime-C2V3C3 Polypeptide Boost Immunization Strategy. *Journal of Virology* 84: 12429-12436.
- Markosyan R, Leung M, Cohen F. 2009. The six-helix bundle of human immunodeficiency virus Env controls pore formation and enlargement and is initiated at residues proximal to the hairpin turn. *Journal of Virology* 83: 10048-10057.
- Marschalkó M, Pónyai K, Kárpáti S. 2015. Sexually transmitted coinfections. *HIV coinfections* 156: 4-9.
- McCaffrey RA, Saunders C, Hensel M, Stamatatos L. 2004. N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *Journal of Virology* 78: 3279-3295.
- McKnight A, Dittmar MT, Moniz-Pereira J, Ariyoshi K, Reeves JD, Hibbitts S, Whitby D, Aarons E, Proudfoot AE, Whittle H, Clapham PR. 1998. A broad range of chemokines receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *Journal of Virology* 72: 4065-4071.

- McKnight A, Shotton C, Cordell J, Jones I, Simmons G, Clapham PR. 1996. Location, exposure and conservation of neutralizing and nonneutralizing epitopes on human immunodeficiency virus type 2 SU glycoprotein. *Journal of Virology* 70: 4598-4606.
- Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan S. 2010. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 7:54.
- Moir S, Chun Tw, Fauci AS. 2011. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6: 223-248.
- Nuvor SV, van der Sande M, Rowland-Jones S, Whittle H, Jaye A. 2006. Natural killer cell function is well preserved in asymptomatic human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) but similar to that of HIV-1 infection when CD4 T-cell counts fall. *Journal of Virology* 80: 2529-2538.
- Nyamweya Samuel, Hegedus, Andrea, Jaye, Assan, Rowland-Jones, Sarah, Flanagan, Katie L. and Macallan, Derek C. 2013. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Reviews in Medical Virology* 23: 221-240.
- Oleske JM, Minnefor AB. 1983. Acquired immune deficiency síndrome in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2: 85-86.
- Ozkaya SG, Holmgren B, da Silva Z, Nielsen J, Nowroozalizadeh S, Esbjörnsson J, Månsson F, Andersson S, Norrgren H, Aaby P, Jansson M, Fenyö EM. 2012. Potent intratype neutralizing activity distinguishes human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) from HIV-1. *Journal of Virology* 86: 961-971.
- Pantaleo G, Fauci AS. 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annual Review of Microbiology* 50: 825-854.
- Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, Bolognesi DP, Fauci AS, Montefiori DC. 1997. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *Journal of Infectious Diseases* 176: 924-932.

- Popper SJ, Sarr AD, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, Kanki PJ. 2000. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *Journal of Virology* 74: 1554-1557.
- Richard J, Cohen EA. 2010. HIV-1 Vpu Disarms Natural Killer Cells. *Cell Host & Microbe* 8: 389-391.
- Santos-Costa Q, Lopes MM, Calado M, Azevedo-Pereira JM. 2014. HIV-2 interaction with cell coreceptors: amino acids within the V1/V2 region of viral envelope are determinant for CCR8, CCR5 and CXCR4 usage. *Retrovirology* 11:99
- Sharp, Paul M., Hahn, Beatrice H. 2011. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1: a006841.
- Shaw GM, Hunter E. 2012. HIV transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2: a006965.
- Shi Y, Brandin E, Vincic E, Jansson M, Blaxhult A, Gyllensten K, Moberg L, Brostrom C, Fenyo EM, Albert J. 2005. Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. *Journal of General Virology* 86: 3385-3396.
- Siewe B, Wallace J, Rygielski S, Stapleton JT, Martin J, Deeks SG, Landay A. 2014. Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PLoS One* 9: e92934
- Silva TI, Aasa-Chapman M, Cotten M, Hué S, Robinson J, Bibollet-Ruche F, Sarge-Njie R, Berry N, Jaye A, Aaby P, Whittle H, Rowland-Jones S, Weiss R. 2012. Potent autologous and heterologous neutralizing antibody responses occur in HIV-2 infection across a broad range of infection outcomes. *Journal of Virology* 86: 930-946.
- Silva T, Cotten M, Rowland-Jones S. 2008. HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends in Microbiology*. 16: 588-595.
- Sourial S, Nilsson C. 2008. HIV-2 neutralization by intact V3-specific Fab fragments. *Virology Journal* 5: 96.

- Steckbeck JD, Kuhlmann AS, Montelaro RC. 2013. C-terminal tail of human immunodeficiency virus 41: functionally rich and structurally enigmatic. *Journal of General Virology* 94: 1-19.
- Taveira N. 2014. HIV-2 envelope: structure, diversity, and evolution. *Encyclopedia of AIDS* 1-6.
- Thomas ER, Shotton C, Weiss RA, Clapham PR, McKnight A. 2003. CD4-dependent and CD4-independent HIV-2: consequences for neutralization. *AIDS* 17: 291-300.
- Turner BG, Summers MF. 1999. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology* 285: 1-32
- Uchtenhagen H, Friemann R, Raszewski G, Spetz AL, Nilsson L, Achour A. 2011. Crystal structure of the HIV-2 neutralizing Fab fragment 7C8 with high specificity to the V3 region of gp125. *PLoS One* 6: e18767.
- UNAIDS. The gap report, 2014.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: e115.
- Visseaux B, Hurtado-Nedelec M, Charpentier C, Collin G, Storto A, Matheron S, Larrouy L, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D; ANRS CO 05 HIV-2 Cohort. 2011. Molecular determinants of HIV-2 R5-X4 tropism in the V3 loop: development of a new genotypic tool. *Journal of Infectious Diseases* 205: 111-120.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422: 307-312.
- Weiss C. 2003. HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. *AIDS Reviews*. 5: 214-21.
- Weiss RA, et al. 1988. HIV-2 antisera cross-neutralize HIV-1. *AIDS* 2: 95-100.
- Wilson SS, Wiens ME, Smith JG. 2013. Antiviral mechanisms of human defensins. *Journal of Molecular Biology* 425: 4965-4980.

- Wilén CB, Tilton JC, Doms RW. 2012. HIV: Cell binding and entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2: a006866.
- Ylinen LM, Keckesova Z, Wilson SJ, Ranasinghe S, Towers GJ. 2005. Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5alpha alleles. *Journal of Virology* 79: 11580-11587.
- Zhang R, Bloch N, Nguyen LA, Kim B, Landau NR. 2014. SAMDH1 Restricts HIV-1 Replication and Regulates Interferon Production in Mouse Myeloid Cells. *PLoS One* 9: e89558.

V. Referências Bibliográficas

Anexo 1 – Composição de meios de cultura e de soluções utilizadas**1. Albumina de Soro Bovino (BSA)**

Para 100 mL de BSA a 5%:

- 5 g de BSA
- 100 mL de Tampão Tris-Salina (TBS) pH 7.4

2. Ampicilina (100 mg/mL)

- 1 g de ampicilina (Sigma-Aldrich, Alemanha)
- 10 mL de água destilada

Dissolver e esterilizar por ultrafiltração com filtro de 22 µm. Armazenar a -20°C.

3. Etanol 70%

- 70 mL de etanol absoluto (marca a ver)
- Preencher até 100 mL com água destilada

4. Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1 mM

- 2,38 g de IPTG (Sigma-Aldrich, Alemanha)
- 10 mL de água destilada

Dissolver e esterilizar por ultrafiltração com filtro de 0,22 µm. Armazenar a -20°C.

5. Meio LB líquido

Para 1 L de meio:

- 10 g de triptona
- 5 g de extrato de levedura
- 5 g de NaCl

Autoclavar e deixar arrefecer até 50°C para adição de outros compostos (antibióticos, por exemplo)

6. Meio LB-Agar

Para 1 L de meio:

- 10 g de triptona
- 5 g de extrato de levedura
- 5 g de NaCl
- 15 g de agar

Autoclavar e deixar arrefecer até 50°C para adição de outros compostos (antibióticos, por exemplo).

7. Solução de agarose 1%

Para 50 mL de solução:

- 0,5 g de agarose tipo II
- 50 mL de TAE

Ferver e deixar arrefecer para a adição de brometo, se necessário.

8. Solução de agarose 0,8%

Para 50 mL de solução:

- 0,4 g de agarose tipo II
- 50 mL de TAE

Ferver e deixar arrefecer para a adição de brometo, se necessário.

9. Tampão Bicarbonato 0.05M pH 9.4

Para 500 mL de solução:

- 1,59 g de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3)
- 2,93 g de Hidrogenocarbonato de Sódio (NaHCO_3)

Dissolver em água destilada com agitação. Medir e ajustar o pH.

10. Tampão Guanidina 6M pH 7.4

Para 1 L de tampão:

- 573,18 g de Guanidina
- 29,22 g de Cloreto de Sódio (NaCl) 0,5M
- 2,7598 g de Hidrogenofosfato de Sódio (NaH_2PO_4) 0,02M

Dissolver em água destilada com agitação. Medir e ajustar o pH.

11. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X

Para 1 L de tampão de stock a 50X:

- 242 g de Tris Base dissolvido em 750 mL de água destilada
- 57,1 mL de ácido acético glacial
- 100 mL EDTA 0.5M (pH 8)

Adicionar água destilada até perfazer 1L. Para fazer 1 L de TAE 1X, adicionar 20 mL de TAE 50X a 980 mL de água destilada.

12. Tampão Tris-Salina (TBS) pH 7.4

Para 1 L de tampão 5X concentrado (Stock):

- 7,88 g TBS 0,01M
- 43,83 g NaCl 0,15M

Dissolver tudo em água destilada. Acertar o pH.

Para 1L de tampão 1X concentrado (utilizado no trabalho)

- 200 mL de TBS 5X
- 800 mL água destilada

13. Tampão TBS-Tween 20

Para 2 L de tampão:

- 400 mL de TBS 1X
- 10 mL de Tween 20 a 0,5%
- 1590 mL de água destilada.

Misturar suavemente para não fazer espuma.

14. Tampão Ureia 8M

Para 1 L de tampão:

- 480,48 g de Ureia
- 29,22 g de NaCl 0,5M
- 2,7598 g de NaH₂PO₄ 0,02M

Colocar água destilada até 500 mL, adicionar os sais e a ureia (50 g de cada vez, até dissolver totalmente). Se necessário, aquecer. Perfazer com água destilada. Após dissolução total, medir e acertar o pH, conforme o necessário.